

Telomeraseaktivität als neuer Prognoseparameter bei Neuroblastomen im Säuglingsalter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Melanie Müller

aus Lübeck

Giessen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Abteilung Hämatologie und Onkologie

Leiter: Prof. Dr. med. L. Gortner
des Universitätsklinikums Gießen

Betreuer: PD Dr. med. H. Christiansen
Gutachter: PD Dr. med. H. Christiansen
Gutachter: Prof. Dr. med. W. Schachenmayr

Tag der Disputation: 22. Mai 2002

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS NEUROBLASTOM	1
1.1.1 Fakten zum Neuroblastom	1
1.1.2 Pathologie des Neuroblastoms	2
1.1.3 Genetik und Molekularbiologie des Neuroblastoms	2
1.1.4 Klinik des Neuroblastoms	4
1.1.5 Diagnostik des Neuroblastoms	5
1.1.6 Prognose des Neuroblastoms	6
1.1.7 Therapie des Neuroblastoms	7
1.2 DIE TELOMERASE	9
1.2.1 Aufbau und Funktion der Telomere	9
1.2.2 Struktur der Telomerase	12
1.2.3 Mechanismus der Telomeraseaktivität	14
1.2.4 Die Rolle der Telomerase in der Tumorgenese	16
1.3 DIE TELOMERASE UND DAS NEUROBLASTOM	18
2. ZIEL DIESER ARBEIT	19
3. MATERIAL	20
3.1 TELOMERASE PCR ELISA-KIT	20
3.2 SONSTIGE MATERIALIEN	21
3.3 GERÄTE	21
4. METHODEN	22
4.1 PCR	22
4.1.1 Rahmenbedingungen der PCR	22
4.1.2 Prinzip der PCR	23
4.1.3 Ergebnis der PCR	24
4.2 ELISA	25
4.2.1 Grundlagen der Immunassays	25
4.2.2 Funktionsweise des ELISA	25
4.2.3 Ergebnis des ELISA	26
4.3 TELOMERASE PCR-ELISA	27
4.3.1 Vorbereitung der Reagenzien aus dem Kit	27
4.3.2 Gewinnung und Aufbereitung der Probenextrakte	27
4.3.3 Kontrollenvorbereitung	27
4.3.4 TRAP: Telomeric Repeat Amplification Protocol	29

4.3.5	ELISA-Protokoll	30
4.3.6	Das Prinzip des Telomerase-PCR-ELISA	32
4.3.7	Auswertung der Meßwerte	35
4.3.7.1	Beurteilung der Kontrollen	35
4.3.7.2	Bearbeitung der Rohwerte	36
5.	ERGEBNISSE	37
5.1	TELOMERASEAKTIVITÄT IN 109 NEUROBLASTOMEN	37
5.2	TELOMERASEAKTIVITÄT IN DEN EINZELNEN STADIEN	38
5.3	TELOMERASEAKTIVITÄT UND ÜBERLEBEN	40
5.4	TELOMERASEAKTIVITÄT UND MYCN-AMPLIFIKATION	45
5.5	TELOMERASEAKTIVITÄT UND LOH 1p	48
5.6	TELOMERASEAKTIVITÄT UND ALTER BEI DIAGNOSESTELLUNG	49
6.	DISKUSSION	52
6.1	ARBEITEN MIT DEM TELOMERASE-PCR-ELISA-KIT	52
6.2	TELOMERASEAKTIVITÄT IN NEUROBLASTOMEN	53
6.3	TELOMERASEAKTIVITÄT ALS PROGNOSEFAKTOR	56
6.4	TELOMERASEAKTIVITÄT UND STADIENEINTEILUNG	58
6.5	KORRELATION DER TELOMERASEAKTIVITÄT MIT ANDEREN GENETISCHEN MARKERN FÜR DAS NEUROBLASTOM	60
6.5.1	Korrelation der Telomeraseaktivität mit MYCN-Amplifikation	60
6.5.2	Korrelation der Telomeraseaktivität mit LOH 1p36	61
7.	ZUSAMMENFASSUNG	63
8.	LITERATURVERZEICHNIS	65
9.	ANHANG	77
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
9.2	LEBENS LAUF	78
9.3	DANKSAGUNG	79

1. EINLEITUNG

1.1 DAS NEUROBLASTOM

1863 beschrieb Rudolf Virchow zum ersten Mal einen abdominellen Tumor mit mikroskopischen Merkmalen eines Glioms, der heute als Neuroblastom bezeichnet wird (Virchow, 1863).

Hierbei handelt es sich um einen hochmalignen neuralen Tumor, der aus Ganglienzellen des Sympathikus hervorgeht und daher überall dort auftreten kann, wo sympathisches Nervengewebe vorliegt. Die bevorzugten Lokalisationen befinden sich in den Nebennieren (35%), den abdominellen Ganglien (20%) und im Thorax (15%). Etwas weniger häufig ist sein Vorkommen im Mediastinum (Riede et al., 1993).

Das Neuroblastom ist nach den Leukämien und den Hirntumoren mit 8-10% Anteil an den kindlichen Krebserkrankungen das dritthäufigste Tumorleiden im Kindesalter (Wargalla-Plate et al., 1995).

Eine Reihe ungewöhnlicher klinischer und biologischer Aspekte machen diesen Tumor besonders interessant. So weist er beispielsweise beträchtliche Variationen in seinem klinischen Bild, seiner Metastasierung und der Prognose auf.

Faszinierend ist die Tatsache, daß der Tumor einerseits in einem Stadium trotz ausgeprägter Leber- und Hautbeteiligung zu spontaner Regression fähig scheint oder zu einem benignen Geschwulst ausreifen kann. Andererseits muß man hingegen ein schnelles, nicht aufzuhaltendes Wachstum in anderen Stadien feststellen (Bachmann et al., 1990).

Heute sind viele auffällige Merkmale des Tumors erforscht und beschrieben. Leider sind im Gegensatz zu den meisten anderen Tumorerkrankungen, deren Therapiemöglichkeiten durch die Fortschritte in der Entwicklung der Chemotherapeutika in den letzten Jahren beträchtlich verbessert worden sind, beim Neuroblastom bisher wenig neue Erfolge zu verzeichnen. So erhofft man sich mit Hilfe weiterer Parameter Informationen über die Biologie des Neuroblastoms in den verschiedenen Stadien zu erhalten und die Prognose sowie die Therapie zu optimieren; vielleicht sogar neue Aspekte für die Behandlung zu schaffen.

1.1.1 FAKTEN ZUM NEUROBLASTOM

Bei einer Prävalenz von einem Erkrankungsfall auf 7000 Lebendgeborene sind in den USA pro Jahr ca. 550 neue Fälle zu verzeichnen. Dies entspricht einer Inzidenz von 0,8-0,9 auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren, wobei Weiße etwas häufiger betroffen sind als Schwarze (Miller et al., 1995; Gurney et al., 1996). In Deutschland erkranken jährlich ungefähr 180-200 Kinder an diesem Tumor (persönliche Auskunft PD Dr. Christiansen).

Es handelt sich um eine Erkrankung hauptsächlich des Kleinkindesalters: der größte Teil der Patienten ist jünger als drei Jahre und fast 50% der Patienten sind bei Diagnosestellung sogar unter 18 Monaten. 95% der Neuroblastome werden vor dem zehnten Lebensjahr klinisch manifest. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt 22 Monate (Brodeur et al., 1997c).

Einige Studien belegen zwei Altersgipfel der Erkrankung: einen vor Vollendung des ersten Lebensjahres und einen weiteren im Alter zwischen zwei und vier Jahren (Voute, 1984).

Eine geschlechtliche Disposition konnte bislang nicht eindeutig erwiesen werden, die meisten großen Studien stellten jedoch eine etwas höhere Erkrankungsrate bei Knaben fest (mit einem Verhältnis Jungen zu Mädchen von 1,2 zu 1) (Brodeur et al., 1997c).

Die Ätiologie des Tumors ist unbekannt. Auslöser sind bisher nicht nachgewiesen und es gibt wenig Anhalt für Umwelt- oder Risikofaktoren der verschiedensten Arten, die zu dieser Erkrankung disponieren (Brodeur et al., 1997c).

1.1.2 PATHOLOGIE DES NEUROBLASTOMS

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen nodulären Tumor von grauer Farbe, der von einer Pseudokapsel umgeben ist. Er ist zumeist sehr weich und kann zerfließen. Im Inneren finden sich häufig Einblutungen, Verkalkungen und Nekrosen. Histologisch sieht man dicht gelagerte, kleine, runde Zellen mit schmalen Plasmasaum, die sich mit beginnender Reifung rosettenförmig anordnen. Sie werden von einem feinen Netzwerk aus Fasern umschlossen und es finden sich oft lymphozytäre Infiltrationen (Bachmann et al., 1990).

Die Zellelemente des Sympathikusneuroblastoms enthalten Katecholamingranula und gehören zum APUD-System (Amin Precursor Uptake and Decarboxylation), einem peripheren endokrinen Zellsystem, dessen gemeinsame Merkmale in der Aufnahme und Decarboxylierung von Aminvorstufen bestehen (Riede et al., 1993).

Histologisch unterscheidet man ein Sympathogonion, ein Sympathoblastom, ein Ganglioneuroblastom und ein Ganglioneurom. Nur die letztgenannte Variante ist klinisch gutartig während die anderen unterschiedliche Grade der Malignität aufweisen und ineinander übergehen können (Bachmann et al., 1990).

1963 beobachteten Beckwith und Perrin bei einer Autopsiestudie an Säuglingen unter drei Monaten, die aus anderen Gründen verstorben waren, kleine In-situ-Neuroblastome in einem von 40 Fällen. Da das manifeste Neuroblastom mit einer Inzidenz von 0,01% bei Lebendgeborenen jedoch sehr viel seltener auftritt, ging man zunächst davon aus, daß der Tumor ca. 200 mal häufiger entsteht, jedoch in der Mehrzahl der Fälle spontaner Regression unterläuft (Beckwith et al., 1963).

1975 dann ergab eine Studie von Turkel und Itabashi an einer Reihe fehlgeborener Kinder, daß neuroblastische Knoten in allen Feten aufzufinden waren, die zwischen der 17. und 20. Gestationswoche abgestorben waren. Von diesem Zeitpunkt an bis zur Geburt oder kurz darauf bilden sich diese Geschwulste zurück und scheinen so lediglich Überbleibsel der fetalen adrenalen Entwicklung zu sein. Unklar ist beim heutigen Stand der Wissenschaft nach wie vor, ob diese Veränderungen Ursprung der Neuroblastomentwicklung sind oder nicht (Turkel et al., 1975).

Trotzdem sind bei keiner anderen malignen Systemerkrankung so viele Fälle von Spontanregression aufgetreten wie beim Neuroblastom und das häufig trotz massiver Metastasierung. Von einer solch spontanen Regression sind fast ausschließlich Kinder im ersten Lebensjahr betroffen (Brodeur, 1997a).

Screening-Studien in Japan und Quebec (Besho et al., 1991; Woods et al., 1992) lassen die Vermutung zu, daß das Neuroblastom doppelt so häufig entsteht wie es klinisch manifest wird und in den unentdeckten Fällen völlig ohne Therapie wieder verschwindet. Spekulationen weisen auf einen Zusammenhang mit einem Faktor hin, der Entwicklung und Ausreifung des Nervengewebes stimuliert. Vielleicht ist dies sogar der NGF (nerve growth factor) selber, ausreichenden Beweise gibt es dafür bisher jedoch nicht.

1.1.3 GENETIK UND MOLEKULARBIOLOGIE DES NEUROBLASTOMS

Die Mechanismen, die zur Entstehung des Neuroblastoms beitragen sind nach wie vor wenig bekannt. Bisherige Studien weisen jedoch eindeutig auf die Beteiligung genetischer Veränderungen hin, die aus dem Tumor, seinen Metastasen oder aus befallenen

Knochenmark bestimmt werden können. Bereits heute sind eine ganze Reihe solcher Veränderungen auf ihre Auswirkungen hinsichtlich der Tumorentstehung oder des Tumorwachstums untersucht worden, die im folgenden kurz genannt werden sollen:

1. Amplifikation des Protoonkogens MYCN

Die Amplifikation des Protoonkogens MYCN, das heißt eine Vervielfachung des Gens in der gleichen Zelle und damit seine erhöhte Expression, kann in 20% aller Neuroblastome nachgewiesen werden. Es umfaßt bis zu mehrere hundert Kopien und korreliert streng mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und einer schlechten Prognose (Brodeur et al., 1984).

Das MYCN Gen erhielt seinen Namen aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem bekannten Protoonkogen c-myc, das wiederum eng mit dem v-myc-Onkogen des Vogelmyelomatose-Virus verwandt ist, welches bei Hühnern ein B-Zell-Lymphom hervorruft (Croce et al., 1990).

Das Protoonkogen c-myc codiert einen ubiquitären Transkriptionsfaktor, der in die Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung involviert ist. Über seine genaue Funktion und seine Rolle in der Tumorgenese ist allerdings kaum etwas bekannt, da bisher nur wenige Ziele von c-MYC identifiziert werden konnten (Wu et al., 1999).

Auch das Genprodukt von MYCN, wie man heute weiß, ist in die Zellproliferation involviert. Es bildet ein Heterodimer, welches die Transkription von Genen aktiviert (Joshi et al., 1997).

Die Analyse der Nukleotidsequenz hat gezeigt, daß die beiden Gene strukturell ähnliche Proteine codieren und zusammen mit einem weiteren verwandten Gen, dem L-myc-Gen, bilden sie die Familie der Myc-Gene. Es ist anzunehmen, daß die Proteine dieser Gene aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft auf die gleiche Weise in die Zellproliferation eingreifen. Die Tatsache, daß die Expression beider Gene sich vermindert, wenn Tumorzellen in Kultur zur Differenzierung gebracht werden, läßt weiterhin ähnliche Kontrollen in der Translation vermuten (Stanton et al., 1986).

Bisher ist MYCN das einzig nachgewiesene amplifizierte Gen bei Neuroblastomen, die HSR (homolog gefärbte Regionen in Metaphasechromosomen bei Analyse des Bandenmusters) oder 'double minutes' (kleine chromosomenähnliche Strukturen ohne Centromere), die Orte der Genamplifikation kennzeichnen, aufweisen (Schwab, 1992; Christiansen et al., 1989).

2. Chromosomenaberration

Hierzu zählt ein Verlust an genetischer Information, der in Tumorzellen als LOH (loss of heterozygosity) bezeichnet wird. In 30-40% der primären Neuroblastome kann man einen solchen Verlust am kurzen Arm des Chromosoms 1 (1p) feststellen (Joshi et al., 1997). Hierbei ist die proximale Bruchstelle variabel, befindet sich aber scheinbar immer distal von 1p36.1 (Fong et al., 1989). Für das Neuroblastom ist diese Deletion von 1p die am meisten erforschte. Mittlerweile gibt es sogar Hinweise auf zwei unterschiedliche Tumorsuppressorgene in diesem Bereich. Der Verlust der Heterozygotie in diesem Bereich korreliert ebenso wie die Amplifikation von MYCN mit einer schlechten Prognose (Christiansen et al., 1994; Brodeur, 1997a).

Weiterhin wurden sehr häufig Verluste an den Chromosomen 11q, 14q, 2q, 9p, und 18q für das Neuroblastom beschrieben, die auf die Existenz weiterer Tumorsuppressorgene an anderen Genorten schließen lassen (Takita et al., 1997).

3. DNA-Polyploidie des Tumors

Der DNA-Gehalt einer Zelle kann mit Hilfe der Flow-Zytometrie ermittelt werden. Er kann entweder erhöht und somit hyperploid oder normal und damit diploid sein.

Tumorzellen mit einem hyperploidem Karyotyp versprechen eine bessere Prognose als solche mit einem diploiden Chromosomensatz (Christiansen et al., 1988). Dies gilt jedoch nur für Kinder im ersten Lebensjahr, deren Hyperploidie durch Zugewinn ganzer Chromosomen zustande kommt, während in älteren Kindern eher strukturelle Veränderungen der Chromosomen nachgewiesen werden können. Hyperploidie bei Neuroblastomen kommt meist in den niedrigeren Stadien vor und geht mit einem guten Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie einher (Brodeur et al., 1997c).

4. Veranlagung

Eine familiäre Häufung von Neuroblastomen konnte beobachtet werden, allerdings hatten weniger als 5% der Patienten einen Verwandten ersten Grades mit dem gleichen Tumor (Maris et al., 1997).

Die klinischen Beobachtungen sprechen für eine autosomal-dominante Vererbung und wurden von Knudson auf das Modell der Zwei-Punkte-Mutation zurückgeführt, welches er schon für das Retinoblastom beschrieben hatte und für den Ausgangspunkt kindlicher maligner Erkrankungen hielt.

Er ging in seinen Untersuchungen davon aus, daß ca. 22% aller Neuroblastome das Ergebnis einer Keimlinienmutation sind, die somit in allen Zellen vorliegt. Kommt es nur in einer Zelle des Zellgewebes zu einer Mutation des allelen Gens, erfolgt die maligne Transformation (Knudson et al., 1972).

1.1.4 KLINIK DES NEUROBLASTOMS

Häufig verursacht der Primärtumor selbst keine Beschwerden. Führende initiale Symptome sind eine tastbare Raumforderung im Abdomen und häufig Zeichen bereits bestehender Metastasen in Leber, Lymphknoten und Knochen (vor allem in der knöchernen Orbita). Allgemeinsymptome wie Anämie, unklares Fieber und Knochenschmerzen können auftreten. Neuroblastomtypische, jedoch nur selten vorkommende Symptome sind: Querschnittssymptomatik durch intraspinales Einwachsen des Tumors, therapieresistenter Durchfall auf dem Boden einer Sezernierung von VIP, Ataxie-Opsomyoklonus und das Horner-Syndrom, welches durch Kompression des Grenzstranges zustande kommt (Brodeur et al., 1997c; Wargalla-Plate et al., 1995).

Nach der Art ihrer Metastasierung kann man die Neuroblastome wie folgt einteilen (Riede et al., 1993):

1. Typ Pepper: ausschließlich Lebermetastasen
2. Typ Smith: überwiegend Hautmetastasen
3. Typ Hutchinson: isolierte Skelettmetastasierung
4. Generalisierter Metastasierungstyp

Im Gegensatz zum Wilms-Tumor, der bevorzugt in die Lunge metastasiert, ist dies beim Neuroblastom äußerst selten, ebenso wie eine Metastasierung in das Gehirn.

Man unterscheidet fünf Stadien für das Neuroblastom, die nach dem Internationalen Neuroblastom-Stadien-System (INSS) von 1988 eingeteilt werden (Brodeur et al., 1988). Kriterien für diese Einteilung liefern klinische, chirurgische und histologische Befunde:

Stadium I	Auf seinen Ursprungsort begrenzter Tumor mit makroskopisch kompletter Exzision, mit oder ohne mikroskopisch verbleibendem Resttumor, ipsilateral und kontralateral histologisch negativ identifizierte Lymphknoten
Stadium IIA	Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Exzision, ipsilateral und kontralateral histologisch negativ identifizierte Lymphknoten
Stadium IIB	Unilateraler Tumor mit kompletter oder inkompletter makroskopischer Exzision, mit positiven ipsilateralen regionalen Lymphknoten, kontralateral histologisch negativ identifizierte Lymphknoten
Stadium III	Tumor überschreitet die Mittellinie mit oder ohne regionaler Lymphknotenbeteiligung, oder unilateraler Tumor mit Beteiligung der kontralateralen Lymphknoten oder Mittelinientumor mit bilateraler Invasion oder bilateraler Lymphknotenbeteiligung
Stadium IV	Ausbreitung des Tumors zu entfernten Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber und/oder anderen Organen (ausgenommen wie in Stadium IVs beschrieben)
Stadium IVs	Lokalisierter Primärtumor wie in Stadium I oder II beschrieben mit Ausbreitung begrenzt auf Leber, Haut und/oder Knochenmark. Nur Säuglinge im ersten Lebensjahr. Nur geringe Knochenmarksinfiltration (<10% Tumorzellen im Ausstrich, MIBG für Knochenmark negativ)

Die Verteilung der Patienten auf die einzelnen INSS-Stadien ergibt sich wie folgt (Wargalla-Plate et al., 1995):

15,5% der Neuroblastompatienten entfallen auf das Stadium I,
 11,8% auf das Stadium II,
 20,9% auf das Stadium III,
 43,6% auf das Stadium IV und
 8,3% auf das Stadium IVs.

Das Stadium IVs, s steht für ‚special‘, spielt aufgrund seiner hervorragenden Prognose eine ganz besondere Rolle im Falle des Neuroblastoms, da es sich um eine spezielle Art der Metastasierung handelt, die häufig bereits sehr ausgeprägt in Haut, Leber oder Knochenmark vorliegt. Betroffen sind fast ausnahmslos Kinder vor dem vollendeten ersten Lebensjahr, deren Tumor zu einem späteren Zeitpunkt spontan regressiert ohne die Notwendigkeit zur therapieren (Matthay, 1998). Das Stadium IVs gegen das Stadium IV abzugrenzen bereitet oft große Schwierigkeiten, da beide klinisch ähnlich in Erscheinung treten können. Gerade hier ist jedoch eine Unterscheidung sehr wichtig, um einen günstigen Verlauf der Erkrankung nicht unnötig durch eine aggressive Therapie zu gefährden.

1.1.5 DIAGNOSTIK DES NEUROBLASTOMS

Der einfachste Nachweis bei Verdacht auf ein Neuroblastom, ist die Messung von Katecholaminmetaboliten im Serum oder noch sensibler im 24-Stunden-Sammelurin. 90% der Patienten mit einem Neuroblastom scheiden Vorstufen von Metaboliten der Katecholamine aus, so daß die Konzentration von Vanillimandelsäure, Homovanillinsäure und Dopamin als zuverlässiger (allerdings nicht beweisender) Tumormarker im Urin verwendet werden kann. Diese Derivate sind zudem geeignete Marker zur Kontrolle der Behandlung, da sich die Werte unter der Therapie normalisieren und ein Wiederanstieg auf ein Rezidiv oder eine Metastasierung hinweisen kann (Brodeur et al., 1997c). In Japan wird dieser Test zur Screeninguntersuchung im Säuglingsalter bereits seit 20 Jahren erfolgreich durchgeführt (Sawada et al., 1991) und auch in Deutschland läuft seit einigen Jahren ein Pilotprojekt in fünf Bundesländern, das die Früherkennung von Neuroblastomen fördern und bei Erfolg auf das gesamte Bundesgebiet ausgeweitet werden soll (Wargalla-Plate et al., 1995).

Weiterhin gehört zur Diagnostik eine Knochenmarkspunktion. Eine Infiltration des Knochenmarks ist zusammen mit einem erhöhten Katecholaminspiegel nahezu beweisend für ein Neuroblastom. Auch die Lichtmikroskopie ermöglicht es, durch den Nachweis einer eindeutigen Pathohistologie ein Neuroblastom zu diagnostizieren (Bachmann et al., 1990).

Weitere diagnostische Maßnahmen sind sämtliche bildgebenden Verfahren, die der Feststellung von Tumorlokalisierung und –ausbreitung dienen. Hier spielt vor allem die Sonographie eine große Rolle, die aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung für den Patienten auch zur Therapiekontrolle mehrfach wiederholt werden kann.

Computertomographie und MRT sind vor allem bei Tumoren, die im Mediastinum sitzen und sich so der manuellen Untersuchung und dem Nachweis durch Ultraschall entziehen, geeignete Untersuchungen. Es läßt sich die genaue Lokalisation und das Ausmaß des Tumors feststellen.

Weiterhin ist die herkömmliche Skelettszintigraphie und die Skelettszintigraphie mit *J-131-Meta-Benzylguanidin* (MIBG) zur Sichtbarmachung des Neuroblastoms und zum Nachweis eines Knochenbefalls unverzichtbar. Bei MIBG handelt sich um einen Noradrenalin-abkömmling, der von 90% der Neuroblastomzellen gespeichert wird (Brodeur et al., 1997c).

Die zahlreichen klinischen Erscheinungsbilder und verschiedenen Lokalisationen machen die Abgrenzung des Neuroblastoms vor allem gegen andere Neoplasien, aber auch nicht neoplastische Erkrankungen besonders schwierig. Differentialdiagnostisch ist in erster Linie an einen Wilms-Tumor, ein Rhabdomyosarkom, eine Raumforderung der Nieren, Leber oder des Gastrointestinal-bzw. Genitaltraktes zu denken.

1.1.6 PROGNOSE DES NEUROBLASTOMS

Die Prognose ist wohl bei keiner anderen Tumorerkrankung so ungleich wie in den einzelnen Stadien des Neuroblastoms. Zahlreiche unterschiedliche Faktoren dienen der Risikoabschätzung und sollten daher so sorgfältig wie möglich erhoben werden:

1. Stadium

Die Zuordnung zu den Stadien des INSS hängt vom Ausmaß des Primärtumors und seiner Metastasierung ab und muß vor Beginn der Behandlung erfolgen. Die Drei-Jahres-Überlebensrate für alle Patienten beträgt in den Stadien I, II und IVs 75-90%. In den Stadien III und IV muß auch das Alter beachtet werden. So ergeben sich für die Stadien III und IV bei den Patienten, die jünger als ein Jahr sind ebenso gute Überlebensraten von 80-90% bzw. 60-75%. Hingegen sind es bei Kindern über einem Jahr im Stadium III nur noch 50%. Im Stadium IV sowie bei Rezidiven ist in dieser Altersgruppe die Prognose beinahe infaust mit einer Heilungschance von unter 20% (Castleberry, 1997).

2. Grading

Die Histologie des Neuroblastoms tendiert vor allem in den Stadien I-III zur Ausreifung und Differenzierung in Richtung des Ganglioneuroblastoms, das mit einem günstigen Verlauf der Erkrankung einhergeht. Eine Einteilung der Malignität in drei Grade erfolgt nach Hughes et al. und reicht von einem Mischbild aus differenzierten und undifferenzierten Zellen (Grad I) bis hin zum Bild eines undifferenzierten, kleinzelligen Tumorgewebes (Grad III) (Hughes et al., 1974).

3. Alter des Patienten bei Diagnosestellung

Da mit zunehmendem Alter die Ausbreitung der Erkrankung zunimmt, ist eine günstigere Prognose für Kinder unter einem Jahr zu beobachten (Joshi et al., 1997).

Alle Stadien zusammen genommen weist die Altersgruppe von 0-11 Monaten eine Überlebensrate von 72% auf, für die Gruppe von 2-24 Monaten von 28% und bei der Gruppe >24 Monate nur noch eine Überlebensrate von 12% (Breslow et al., 1971). Nur 5,9% aller Neuroblastompatienten unter einem Jahr gehören dem Stadium IV an (Wargalla-Plate et al., 1995).

4. MYCN-Amplifikation, LOH 1p und Tumorkaryotyp

Wie bereits erwähnt gibt es eine Vielzahl von genetischen Markern, die für einen schlechten Verlauf der Erkrankung sprechen, wobei die wichtigsten die Amplifikation von MYCN, die vorwiegend in den fortgeschritteneren Stadien zu finden ist, der Verlust von genetischem Material im Bereich des Chromosoms 1p36 und ein diploider Karyotyp sind (Brodeur et al., 1992 und 1995a).

5. LDH, Ferritin, NSE

Diese drei Laborparameter sind nicht spezifisch für das Neuroblastom, lassen aber bei einem erhöhten Serumspiegel einerseits auf eine Progression des Tumors schließen und können andererseits zur Erfolgskontrolle der Therapie herangezogen werden. Persistierend hohe Spiegel können nach abgeschlossener Behandlung den ersten Hinweis auf ein Rezidiv geben oder ein Nicht-Ansprechen der Therapie anzeigen.

LDH ist in 64%, Ferritin in 38% und NSE in 73% der Neuroblastome erhöht (Wargalla-Plate et al., 1995).

6. TRK-A Expression

Die Expression zahlreicher Gene ist aufgrund ihres möglichen Einflusses auf die Tumorentstehung und die Prognose untersucht worden. Als sehr vielversprechend erwies sich hier die Expression des Neurotrophin-Rezeptor-Gens: TRK-A, welches den Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor (NGF) kodiert, der wiederum eine wichtige Rolle in der Induktion der Zelldifferenzierung zu spielen scheint. Eine hohe Expression dieses Gens geht mit anderen vorteilhaften Merkmalen wie fehlende MYCN-Amplifikation, Säuglingsalter, niedriges Erkrankungsstadium und einer guten Prognose einher (Castleberry, 1997).

Anhand dieser und einiger anderer Merkmale kann das Neuroblastom in drei Risikogruppen eingeteilt werden (Brodeur et al., 1997b):

Parameter	Typ 1	Typ 2	Typ 3
MYCN	Normal	Normal	Amplifiziert
DNA-Ploidie	Hyperdiploid oder beinahe Triploid	Beinahe Diploid oder beinahe Tetraploid	Beinahe Diploid oder beinahe Tetraploid
1p LOH	<5%	25-50%	80-90%
14q LOH	<5%	25-50%	<5%
TRK-A Expression	Hoch	Niedrig	Niedrig oder fehlend
Alter	i.d.R. <1 Jahr	i.d.R. > 1 Jahr	i.d.R. 1-5 Jahre
INSS	i.d.R. I, II, IVs	i.d.R. III, IV	i.d.R. III, IV
3-JÜR	~95%	25-50%	<5%

Für sich alleine betrachtet sind die zwei aussagekräftigsten klinischen Parameter das Stadium und das Erkrankungsalter des Patienten bei Diagnosestellung (Castleberry, 1997).

Bachmann et al. stellten in ihren eigenen Untersuchungen fest, daß nach einer zweijährigen Symptombefreiheit eine ‚klinische Heilung‘ angenommen werden kann (Bachmann et al., 1990).

1.1.7 THERAPIE DES NEUROBLASTOMS

Die Therapie des Neuroblastoms erfolgt stadien- und risikoadaptiert und orientiert sich an den Richtlinien der Neuroblastomstudie NB 90. Sie besteht in Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie oder deren Kombination. Eine Knochenmarkstransplantation kann zu einem späteren Zeitpunkt notwendig werden.

Stadium (gemäß INSS)	Therapie
Stadium I	Operation
Stadium II	Operation und Polychemotherapie (4 Kurse), evtl. Zweitoperation
Stadium III	Operation und Polychemotherapie (4 bis 8 Kurse), evtl. Zweitoperation, lokale Nachbestrahlung, niedrigdosierte Dauerchemotherapie für ein Jahr
Stadium IV	Operation und Polychemotherapie (8 Kurse), evtl. Zweit- oder Drittoperation, lokale Nachbestrahlung, niedrigdosierte Dauerchemotherapie für ein Jahr oder autologe Knochenmarkstransplantation
Stadium IVs	Keine Therapie bzw. individuelle Behandlung je nach Symptomen

Operation

Vorrangig sollte immer die komplette Resektion des Tumors sein oder zumindest eine größtmögliche Reduktion der Tumormasse. Zudem bietet dieses Vorgehen auch noch diagnostische Möglichkeiten und eine bessere Ausgangsbasis für folgende Chemotherapien oder Bestrahlungen (Wargalla-Plate et al., 1995).

Bestrahlung

Sie besteht aus einer Megavolttherapie von 15-30 Gy auf das Tumorbett und ist abhängig vom Alter der Patienten, der Tumormasse und der –lokalisation (Brodeur, 1997c).

Das Hauptindikationsgebiet der Radiatio ist das Stadium III, in dem man häufig einen als inoperabel bezeichneten Tumor durch Bestrahlung so weit zurückdrängt, daß er einer Operation zugänglich wird. Im Stadium II kann nach inkompletter Tumorentfernung eine postoperative kombinierte Radiochemotherapie indiziert sein, während sie im Stadium IV lediglich palliativen Charakter bietet.

Komplikationen, die mit der Bestrahlung einhergehen können, sind unter anderem Wachstumsstörungen, Strahlenschäden an Leber und Niere bis hin zur Fibrose, Infertilität der weiblichen Patienten und die Gefahr der Entwicklung von Sekundärmalignomen im späteren Leben (Bachmann et al., 1990).

Chemotherapie

Als Chemotherapeutika mit nachgewiesener Wirkung auf Neuroblastomzellen stehen unter anderem Cyclophosphamid, Doxorubicin, VM-26 (Vumon) und Cisplatin zur Verfügung. Sie werden in einer Kombinationstherapie in verschiedenen Zyklen verabreicht, wobei man synergistische Effekte der Medikamente sowie eine Dosisreduktion der Einzelstoffe erreicht (Brodeur et al., 1997c).

Mit der Zunahme der molekularbiologischen Untersuchungsmöglichkeiten scheint eine genauere Risikoabschätzung und damit eine gezielte Therapie möglich zu sein. Viele der genetischen Einzelheiten werden in Zukunft vielleicht sogar der Gentherapie einen Ansatz bieten und so die Überlebenschancen der Neuroblastompatienten beträchtlich optimieren.

1.2 DIE TELOMERASE

In den letzten zehn Jahren war die Telomerase Gegenstand unzähliger Veröffentlichungen und dieser Trend scheint sich auch in Zukunft fortzusetzen. Der Grund hierfür ist der Nachweis dieses Enzyms in den meisten menschlichen Tumoren und seine Assoziation mit Malignität. Man vermutet daher eine Schlüsselrolle der Telomerase bei der Immortalisation von Zellen und somit auch bei der Entstehung von Tumoren (Shay, 1997a).

Bekanntermaßen unterscheiden sich Krebszellen von den meisten normalen Zellen durch ihre Fähigkeit zu unendlich vielen Teilungen und damit zu einer kaum aufzuhaltenden, unregulierten Progression des Tumors. Zahlreiche Faktoren wie Onkogene und Tumorsuppressorgene, die sich auf die Wachstumskontrolle einer Zelle auswirken, sind beschrieben worden (Campisi, 1997). Ein übergeordneter Mechanismus, der sich auf die Mehrzahl aller Tumoren anwenden läßt, konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden.

Da das Teilungspotential einer Zelle normalerweise durch die Verkürzung der Chromosomenenden (Telomere) mit jeder Zellteilung begrenzt ist (Hayflick, 1965), müssen Krebszellen einen Mechanismus entwickeln, der es ihnen erlaubt dieses Problem zu umgehen. Nach den heutigen Erkenntnissen verleiht die Telomerase einer Zelle die Möglichkeit die Telomerverkürzung und damit den Proliferationsstop aufzuhalten.

Damit könnte die Progression eines Tumors maßgeblich von der Aktivierung der Telomerase abhängig sein. Um ihre Rolle bei der Zellproliferation und der Entstehung von Tumoren besser zu verstehen, sind Kenntnisse über die Telomere sowie von Struktur und Funktion der Telomerase unerlässlich.

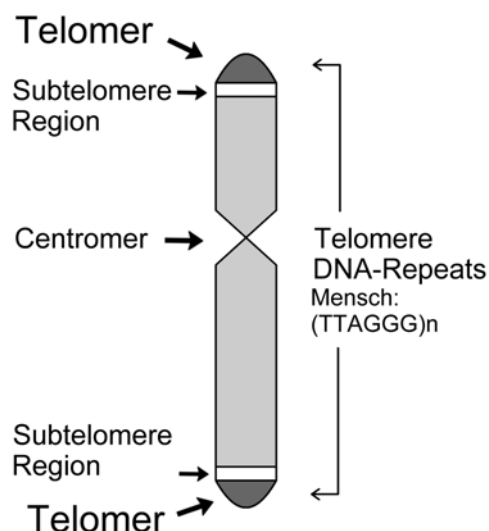
1.2.1 AUFBAU UND FUNKTION DER TELOMERE

Eukaryoten besitzen lineare Chromosomen, deren Enden eine besondere Struktur aufweisen und als Telomere bezeichnet werden (Greider, 1996).

Sie wurden erstmals 1938 von Müller beschrieben, der auch den Begriff der ‚Telomere‘ prägte. Unabhängig davon wurde auch McClintock 1948 auf eine spezielle Struktur der endständigen DNA der Chromosome aufmerksam (Müller, 1938; McClintock, 1941).

ABB. 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES METAPHASECHROMOSOMS MIT TELOMEREN

(von Dahse et al., 1997; aus Clin Chem (43) pp 709)



Struktur der Telomere (Greider, 1996)

Die Telomere setzen sich aus DNA und verschiedenen an diese bindenden Proteinen (‚telomere binding proteins‘) zusammen.

Ihre DNA-Komponente besteht aus einer charakteristischen Basensequenz, die sich vielfach wiederholt aneinanderreicht, jedoch kein transkribierbares Gen codiert.

Diese Sequenz ist in ihrer Länge und Basenabfolge von Spezies zu Spezies verschieden und weist in 5‘-3‘-Richtung des DNA-Stranges einen relativ hohen Gehalt an der Base Guanin auf.

Je nach Gewebeart besteht sie beim Menschen und anderen Säugetieren aus bis zu 200.000 Basenpaaren umfassenden Wiederholungen von TTAGGG. Für den Ziliaten Tetrahymena, bei dem das Enzym Telomerase als erstes beschrieben wurde, hingegen ist die Wiederholung der Nukleotide TTGGGG charakteristisch.

Über die Strukturproteine der Telomere ist im Gegensatz zu ihrer DNA bisher wenig bekannt. Sie unterscheiden sich aber nachweislich von den Proteinen, die an der internen DNA eines Chromosoms gebunden sind. Die am besten charakterisierten Beispiele stammen auch hier wieder von Tetrahymena, wie das sogenannte Protein RAP1 (Repressor activator enzyme). Obwohl genaue Informationen über ihre biologische Rolle bisher fehlen, gibt es Hinweise darauf, daß auch die Proteine der Telomere einen entscheidenden Einfluß auf die Regulation der Telomerlänge haben.

Funktion der Telomere

Dem Telomer-Chromatin-Komplex werden eine Reihe wichtiger Funktionen in der Zelle zugeschrieben:

1. Als wichtigste Rolle verleiht er den Chromosomen Schutz und Stabilität. Degradation, Translokation, Non-disjunction oder Fusion von Chromosomen sind Phänomene, die bei mangelnder Telomerlänge nachgewiesen werden konnten. (Hoos, 1998)
2. Er gewährleistet die spezifische Position der Chromosomen im Zellkern, da er während der Zellteilung als Anheftungsstelle an der Kernmatrix dient (Rhode et al., 1998). Die Telomere wirken bei der Paarung homologer Chromosomen in der Meiose und bei der Bewegung der Chromosomen während der Teilung mit (Morin et al., 1997).
3. Er ermöglicht die vollständige Replikation der linearen DNA-Enden (Rhode et al., 1998).

Die Mechanismen, die für die ersten beiden Funktionen verantwortlich sind, sind bisher noch nicht eindeutig geklärt, machen jedoch die Bedeutung der Telomere für die Zelle verständlich.

Mit Bekanntwerden der Doppelstruktur der DNA und ihrer semikonservativen Struktur wurde die dritte Aufgabe der Telomeren deutlich, die als Endreplikationsproblem beschrieben wird.

Das ‚Endreplikationsproblem‘ (Levy, 1992)

Die Replikation des endständigen DNA-Abschnittes eines Chromosoms weist die folgende Problematik auf:

Bekanntermaßen ist die DNA-Polymerase nicht in der Lage die DNA vom 3′- zum 5′-Ende zu synthetisieren, so daß die DNA-Verdopplung des einen Stranges diskontinuierlich in sogenannten Okazaki-Fragmenten erfolgt. Hierfür benötigt die DNA-Polymerase einen 8-12 Basenpaare umfassenden RNA-Primer als Startpunkt, um die Synthese in 5′-3′-Richtung zu starten. Im Anschluß an die Replikation werden diese Primer wieder entfernt. Die verbliebenen Lücken werden von einer weiteren Polymerase aufgefüllt. Eine Komplementierung des DNA-Stranges am äußersten 3′-Ende der chromosomalen DNA ist aufgrund eines fehlenden Ansatzpunktes für das Replikationsenzym nicht möglich.

Daraus resultiert bei jeder Zellteilung ein Verlust von 50 bis 200 Basenpaaren, der zum Endreplikationsproblem führt (siehe Abbildung 2).

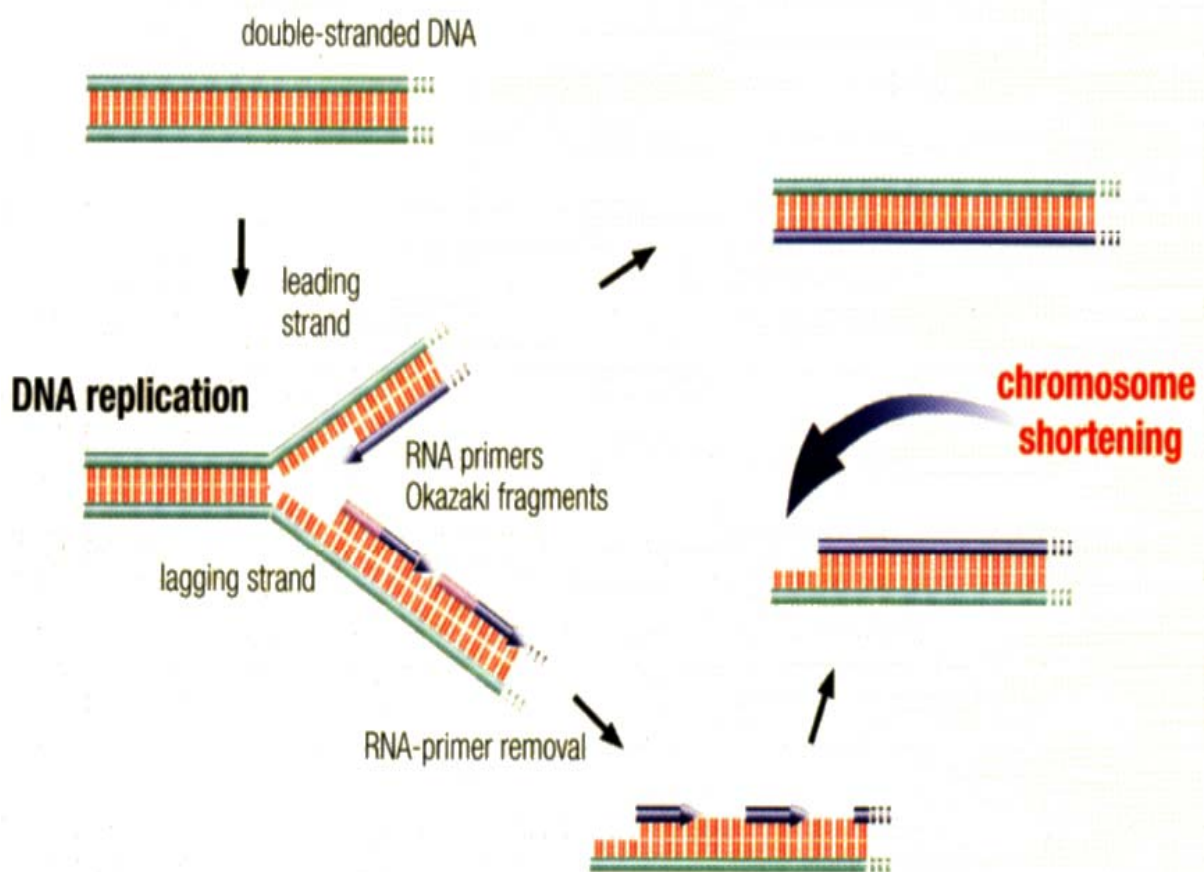
Dank der Telomere ist hiervon zunächst nicht die eigentliche Erbinformation betroffen.

In Abhängigkeit von Zelltyp, Spezies und genetischer Ausstattung einer Zelle wird nach 60-80 Teilungen eine kritische Länge der Telomere erreicht, die bei 1500-4000 Basenpaaren liegt. Ihre Funktion geht verloren. Es kommt zum Stillstand im Zellzyklus (Seneszenz) mit dem anschließenden Tod der Zelle. Die Telomere übernehmen die Aufgabe einer sogenannten ‚mitotischen Uhr‘. Die Anzahl der Zellteilungen wird registriert und bei Unterschreiten einer Mindestlänge der Telomere wird der Zellzyklus beendet; es folgen keine weiteren Replikationen mehr.

In den meisten menschlichen Zellen wird die Länge der Telomere nicht stabilisiert und nimmt so mit steigendem Alter eines Individuums ab.

ABB. 2: DAS ENDREPLIKATIONSPROBLEM

(aus Informationsbroschüre der Firma Boehringer Mannheim für Telomerase-PCR-ELISA)



1.2.2 STRUKTUR DER TELOMERASE

Die Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, bestehend aus RNA, mindestens zwei Proteinuntereinheiten und einem Molekulargewicht zwischen 200 und 500 kD (Blackburn, 1992).

Da ihr für die DNA-Synthese ein RNA-Template als Matrize dient, zählt man sie zu den reversen Transkriptasen, mit der ungewöhnlichen Ausnahme, daß die benötigte RNA bereits im Enzym integriert ist. Es bestehen jedoch nicht nur funktionelle, sondern auch strukturelle Ähnlichkeiten mit reversen Transkriptasen, wie sequenzielle Übereinstimmungen in den aktiven Zentren dieser Enzyme und der Telomeraseproteine bestätigen (Nakamura et al., 1998).

RNA

Aufschluß über den RNA-Anteil der Telomerase gaben die Experimente von Greider und Blackburn 1987. Sie inkubierten einen Zellextrakt, der bekannterweise Telomerase enthielt, mit RNase und konnten im Anschluß daran keine Telomeraseaktivität mehr nachweisen. Dies war der Beweis dafür, daß neben Proteinen auch RNA eine essentielle Rolle im Komplex dieses Enzyms spielen mußte (Greider et al., 1987). 1989 konnten Greider und Blackburn diese Annahme durch Isolierung von 159 RNA-Nukleotiden aus dem Telomerasekomplex sichern. Sie erkannten, daß das RNA-Template der Telomerase die entscheidende Sequenz in eineinhalbfacher Kopie enthält. Sie vermuteten, daß dieser zusätzliche Anteil der Telomerase die Bindung an die Telomere erlaubte, während der verbleibende Anteil noch als vollständige Matrize dienen kann (Greider et al., 1989). Man weiß heute, daß RNA nicht nur im Komplex der Telomerase integriert ist, sondern daß sie entscheidend für die Determinierung der Telomersequenz ist. So führten Manipulationen wie Punktmutationen an der RNA der Telomerase zu veränderten Sequenzen der Telomere (Greider, 1996).

Die Telomerase-RNA von Tetrahymena ist in der Region von Position 43-51 mit der Sequenz 5'CAACCCCAA3' komplementär zu der spezifischen Sequenz der Telomeren von Tetrahymena (,TTTTGGGG'). Expression einer Antisense-Telomerase-RNA verhindert die Verlängerung der Telomeren und führt zum Zelltod (Feng et al., 1995).

Von über 20 Ziliaten, verschiedenen Pilzen, sowie auch von Maus und Mensch ist das RNA-Template der Telomerase mittlerweile identifiziert und sequenziert. Hierbei variiert die Länge der RNA von 150-200 Nukleotiden in Ziliaten über etwa 450 Nukleotide in Säugetieren wie Mensch und Maus bis hin zu ca. 1300 Nukleotiden in Hefepilzen wie *Saccharomyces cerevisiae*. Sie alle enthalten eine für die Spezies spezifische Region, die zu der Basenabfolge ihrer Telomere komplementär ist (Greider, 1996).

Seit 1995 ist die 560 Basenpaare umfassende RNA-Sequenz in der Telomerase des Menschen beschrieben (Feng et al., 1995) und zwei Jahre später konnte der Locus des Gens, das diese RNA-Komponente der Telomerase kodiert, auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (3q26.3) lokalisiert werden (Soder et al., 1997).

Proteine

Im Gegensatz zur RNA-Komponente der Telomerase ist über ihren Proteinkomplex, welcher verantwortlich für ihre katalytische Funktion ist, nach wie vor wenig bekannt. Dies ist einerseits auf die extrem geringen Mengen, in denen das Enzym in den meisten Zellen vorliegt und andererseits auf die Schwierigkeit der Sequenzanalyse von Proteinen zurückzuführen.

Seit 1995 sind zwei telomerase-assoziierte Proteine (p80 und p95) von Tetrahymena bekannt und geklont (Greider, 1996). Harrington et al. berichteten, daß p80-ähnliche Proteine in

Menschen-, Maus- und Ratten-Telomerase gefunden wurde (Harrington et al., 1997). Das Homolog der Säugetiere zu p80 wird als hTLP1 bezeichnet und ist ebenfalls bereits geklont, für p95 ist bisher kein menschliches Homolog bekannt (Ulaner et al., 1998).

Bisher konnte jedoch niemand die Notwendigkeit von p80 und p95 für die Aktivität der Telomerase wirklich beweisen (Barinaga, 1997).

Auch Lingner et al. berichteten 1997 in ihren Studien mit *Euplote aediculatus* von der Isolation und Sequenzierung zweier Proteine p123 und p43, die mit Telomeraseaktivität assoziiert sind. p123 besitzt an verschiedenen Stellen ähnliche Sequenzen wie die aktiven Zentren bekannter reverser Transkriptasen (Lingner et al., 1997a).

Eine weitere Arbeitsgruppe unter Lendvay hatte mit mutierten Hefezellen gearbeitet, deren Telomere sich vermutlich aufgrund einer fehlerhaften Telomerase verkürzten. Sie fanden Mutationen in vier verschiedene Genen, die sie als EST(ever-shorter telomeres) –1 bis –4 - Gene bezeichneten (Lendvay et al., 1996). Die Sequenz des EST2-Gens und die Sequenz des von Lingner isolierte Proteins konnten als identisch beschrieben werden. Künstlich herbeigeführte Mutationen in diesem Gen führten zu einer Telomerverkürzung, die identisch war mit der Telomerverkürzung bei komplettem Fehlen dieses Gens. Die mutierte Telomerase war nicht in der Lage die Telomere zu verlängern. Das legte die Vermutung sehr nahe, daß es sich bei diesem Protein tatsächlich um die katalytische Untereinheit der Telomerase handelt (Lingner et al., 1997b).

Einige Monate später fand Meyerson aufgrund der signifikanten Ähnlichkeit zu EST2 und zu p123 das Homolog im menschlichen Genom auf Chromosom 5 und nannte es hEST2 (auch hTERT genannt) (Meyerson et al., 1997).

Das Genprodukt von hEST2 scheint die Hauptdeterminante der Enzymaktivität der Telomerase in der menschlichen Zelle zu sein.

Identifizierte Telomerase-Komponenten bis Mitte 1999 (Greider, 1999)

	Tetrahymena	Euplotes	Mensch/Maus	Yeast (<i>S.cerev.</i>)
PROTEINE	p95 p80----- tTert-----	----- ----p123(TERT)- p43	TEP1 ----hTERT-----	-----Est2 Est 1 Est3 Cdc13 (Est4)
RNA	159 nt Sekundärstruktur bekannt	~200 nt Sekundärstruktur bekannt	~395-450 nt Sekundärstruktur <u>unbekannt</u>	~1300 nt Sekundärstruktur <u>unbekannt</u>

Regulation der Telomeraseaktivität

Es gibt eindeutige Hinweise auf das Vorhandensein von Genen, welche die Telomeraseaktivität regulieren. Ihr Verlust beispielsweise durch Mutationen könnte eine Reaktivierung der Telomerase während der Tumorphprogression erklären. Beispielsweise führte die Einschleusung des menschlichen Chromosoms 3 in die Zelle einer Nierenkarzinomzelllinie zur Repression der Telomeraseaktivität, Verkürzung der Telomeren und damit zur Seneszenz (Ohmura et al., 1995; Mehle et al., 1998).

Eine pharmakologischer Induktion der Zelldifferenzierung kann ebenfalls eine Inhibition der Telomeraseaktivität bewirken und belegt eine Abnahme der Telomeraseaktivität mit zunehmendem Grad der Differenzierung (Albanell et al., 1996).

Die Tatsache, daß die Telomeren nur auf eine bestimmte mittlere Länge verlängert werden, spricht zudem für eine Kontrolle der Telomeraseaktivität durch eine Interaktion von Telomere und Telomerase, beispielsweise über Telomerbindungsproteine (Hoos et al., 1999).

1.2.3 MECHANISMUS DER TELOMERASEAKTIVITÄT

Man geht davon aus, daß zwei unabhängige Seiten des Enzyms mit dem Primer interagieren. Zum einen die Seite, welche die RNA und das katalytische Zentrum enthält und sich an das 3'-Ende des Primers setzt um diesen zu verlängern. Die andere Seite bindet an das 5'-Ende und stabilisiert den Weg für den neu entstandenen Strang. Auf diese Weise bleibt das Enzym auch nach vollzogener Synthese eines Templates am Strang haften, wenn dieser sich weiterbewegt, um ein neues Template anzuhängen. Dieses Modell orientiert sich an dem Modell der RNA-Polymerase für die Synthese der DNA (Greider, 1991).

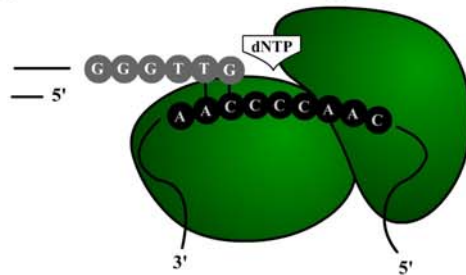
Für die Synthese des G-reichen DNA-Stranges benötigt das Enzym aktivierte Nukleosidtriphosphate und einen DNA-Primer, an den die Sequenzen in der gewöhnlichen 5'-3'-Richtung angefügt werden. In vitro Versuche zeigten, daß die effektivsten Primer aus einer der Telomersequenz ähnlichen oder gleichen Basenabfolge bestehen. Dabei spielt es keine Rolle, ob das 3'-Ende des Primers auf TTGGG, GGTT oder auch TTGG endet, die Telomerase fügt immer exakt die Basen an, die zu einer Telomerverlängerung mit der charakteristischen Sequenz führen (Blackburn, 1992).

Es wird spekuliert, daß eine Standard-Polymerase die Telomere anschließend zu Doppelsträngen vervollständigt, indem sie den DNA-Strang mit Hilfe der von der Telomerase synthetisierten Region komplementiert (Morin et al., 1997).

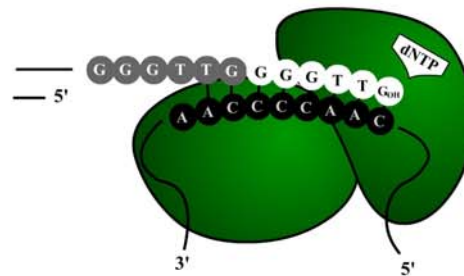
Die Elongationsrate der Telomerase ist mit 74 Nukleotiden pro Minute im Vergleich zu den Polymerasen von E. coli und anderen reversen Transkriptasen, die eine Rate von 10 Nukleotiden pro Sekunde (Polymerase I) oder sogar 100 Nukleotiden pro Sekunde (Polymerase III) schaffen, eher langsam (Blackburn, 1992).

ABB. 3: MECHANISMUS DER TELOMERASEAKTIVITÄT
(aus J Natl Cancer Inst 1995 (87), pp 886)

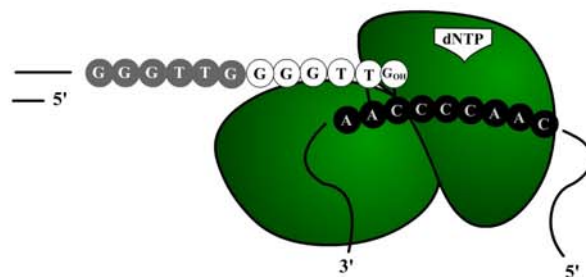
1. Bindung an das RNA-Template



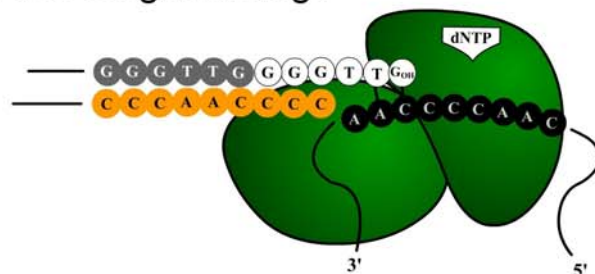
2. Polymerisation



3. Translokation



4. Polymerisation des Gegenstrangs



5. Wiederholung des Vorgangs

1.2.4 DIE ROLLE DER TELOMERASE IN DER TUMORGENESE

Um die Bedeutung der Telomerase für die Entstehung und das Wachstum menschlicher Tumoren zu verstehen, wurden zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Tumorgeweben durchgeführt. In 85% von 400 untersuchten verschiedenen malignen Tumoren konnte eindeutig Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In entsprechenden Proben von gesunden Geweben war dies nicht der Fall (Dahse et al., 1997). Die anfängliche Euphorie über den Nachweis der Telomerase in malignen Tumoren bei gleichzeitigem Fehlen in normalen menschlichen Zellen, wurde etwas gedämpft, als Telomeraseaktivität auch in Keimlinienzellen, Stammzellen des hämatopoetischen Systems und anderen Zellen mit physiologischer Regeneration festgestellt werden konnte (Shay, 1997a; Broccoli et al., 1995; Wright et al., 1996).

Man erklärt sich dies anhand der Tatsache, daß diese Zellen ein größeres Teilungspotential im Vergleich zu anderen Zellen erfordern. Bis auf die Keimlinienzellen, deren Telomerlänge unabhängig vom Lebensalters des Individuums komplett erhalten wird, weisen diese Zellen eine schwächere Telomeraseaktivität als Tumorzellen auf, so daß die Aktivität des Enzyms zu einem langsameren Abbau der Telomere, nicht jedoch zu einer vollständigen Erhaltung führt (Holt et al., 1997). Telomeraseaktivität ist nicht nur Ausdruck von Zellproliferation, sondern sie hängt auch vom Differenzierungsgrad einer Zelle ab. Dies wird deutlich anhand reifer Lymphozyten, die bei einer Aktivierung Telomerase exprimieren und in Ruhe wieder reprimieren können (Hoos et al., 1999).

Tumoren entstehen, wenn die existierenden Kontrollinstanzen in einer Zelle umgangen werden und es dadurch zur unkontrollierten Proliferation kommt.

In diesem Zusammenhang weist das Modell für die Überwindung der Zellalterungsstadien der Telomerase folgende mögliche Rolle zu (Wright et al., 1992; Kipling, 1995). Man unterscheidet zwei Mortalitätsstadien M1 und M2, die weitgehend unabhängig voneinander sind. Das Stadium M1 wird nach einer definierten Anzahl an Zellteilungen erreicht und bezeichnet den Übertritt einer Zelle in die Phase der Seneszenz, in der keine weiteren Teilungen mehr stattfinden. Der antiproliferativen Mechanismus könnte zu diesem Zeitpunkt bereits durch signifikante Telomerverkürzung verursacht werden. Diese Verkürzungen führen an einigen Chromosomenenden zu einer ‚nackten‘ DNA, die ein Signal für DNA-Schädigung ‚aussenden‘. Tumorsuppressorgene und deren Proteine wie p53 und pRB scheinen dadurch aktiviert zu werden und bedingen den Wachstumsstop der Zelle. Die meisten alternden Zellen verbleiben in dieser Phase der Seneszenz bis sie schließlich sterben.

Virale Onkoproteine oder Mutationen, die die Aktivität von Tumorsuppressorgen unterbinden, verhelfen der Zelle das Stadium M2 zu erreichen. An dieser Stelle scheinen die Telomere jetzt die entscheidende Rolle zu spielen. Die Telomere haben eine kritische Länge erreicht und nur wenige Zellen, denen es gelingt ihre lebenswichtigen Telomere zu stabilisieren, können in das Stadium der Immortalität eintreten (Counter et al., 1992). Ohne Telomerase oder einen alternativen Mechanismus kann eine Zelle das Mortalitätsstadium nach bisherigen Erkenntnissen nicht überwinden.

Das Enzym versetzt Zellen also in die Lage, sich ungehindert zu teilen. Sie verfügen damit über das Potential ausreichend genetische Defekte zu akquirieren, die dann wiederum zur malignen Transformation führen können. Man spricht von der ‚Multihit-Theorie‘ der Krebsentstehung. Diese besagt, daß in einer Zelle mehrere Mutationen angereichert werden müssen, bevor sie maligne entartet. Diese Akkumulation von Mutationen erfordert exzessive Proliferation. Die Telomerlänge begrenzt im Normalfall das Teilungspotential und wirkt damit der Krebsentstehung entgegen (Rhyu, 1995).

1.3 DIE TELOMERASE UND DAS NEUROBLASTOM

Telomeraseaktivität ist während der fetalen Entwicklung in neuroblastischen Zellen nachweisbar und verschwindet kurz vor bzw. nach der Geburt durch Repression des Enzyms (Hiayma et al., 1995b). Man vermutet daher, daß kindliche Tumorerkrankungen eher auf der Unfähigkeit beruhen Telomerase zu inaktivieren, während hingegen bei den meisten Erwachsenen eine Reaktivierung der Telomerase vorliegen könnte.

Die Progression eines Tumors könnte also maßgeblich von der Aktivierung der Telomerase abhängen, was die Hoffnung aufkommen läßt, daß eine Hemmung der Telomeraseaktivität gleichzeitig zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt (Klingelhutz, 1997). Es könnten hier neue Wege in der Tumorforschung beschritten werden, die Verbesserungen in der Erkennung, der Risikoeinteilung und der Therapie von Tumoren ermöglichen.

Die zahlreichen bis dato bereits durchgeführten Studien der Telomeraseaktivität an den unterschiedlichsten Tumoren belegen einen deutlichen Zusammenhang der Aktivität des Enzyms mit Malignität, was die Telomerase als Tumormarker charakterisiert (Hoos et al., 1999). Diese Tatsache macht sie besonders interessant für das Neuroblastom. Denn gerade dieser Tumor mit seinen zahlreichen verschiedenen Verlaufsformen und der daraus resultierenden unterschiedlichen Prognose verlangt immer wieder nach neuen genetischen Markern, die einen Hinweis auf den weiteren Verlauf der Erkrankung geben können und so einen sinnvollen Einsatz der vorhandenen Therapiemöglichkeiten gewährleisten.

Jüngste Untersuchungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen den Onkogenen der MYC-Familie und der katalytischen Untereinheit der Telomerase hin. Da das für das Neuroblastom so bedeutsame Gen MYCN ebenfalls aus der Familie der MYC-Onkogene stammt, ist die Frage nach der Interaktion dieser beiden von großem Interesse (Wang et al., 1998).

2. ZIEL DIESER ARBEIT

Die Ziele dieser Arbeit waren:

- Die Bestimmung der Telomeraseaktivität in humanen Neuroblastomen mit Hilfe des Kits für Telomerase-PCR-ELISA der Firma Boehringer Mannheim und die Prüfung der Methode auf die Möglichkeit des Einsatzes in der Routinediagnostik des Neuroblastomlabors.
- Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Telomeraseaktivität als prognostischer Marker für Patienten mit einem Neuroblastom geeignet ist. Hierfür sollte die Telomeraseaktivität der Neuroblastome mit der Überlebenszeit der Patienten verglichen werden.
- Aufgrund des bekannten prognostischen Unterschiedes des Alters bei Diagnosestellung wurden die Patienten in zwei Altersgruppen unterteilt. Die Bedeutung der Telomeraseaktivität für den Verlauf der Erkrankung in diesen beiden Altersgruppen sollte festgestellt und eventuell bestehende Unterschiede untersucht werden.
- Die Zugehörigkeit zu bestimmten Stadien des Neuroblastoms ist oft nicht einfach, aber von entscheidender Bedeutung für die Therapie und Prognose des Patienten. Liefert die Telomerase zusätzliche Informationen für eine exakte Stadieneinteilung?
Kann man über die disseminierten Stadien IV und IVs, die klinisch sehr schwer zu unterscheiden sind, mit Hilfe der Telomeraseaktivität eine verlässliche Unterscheidung erreichen?
- Von besonderem Interesse war die Frage nach der Korrelation von Telomeraseaktivität mit anderen genetischen Markern für das Neuroblastom wie MYCN-Amplifikation und Heterozygotieverlust im Bereich von 1p36.

3. MATERIAL

3.1 TELOMERASE PCR ELISA-KIT (VON BOEHRINGER MANNHEIM)

Der Nachweis der Telomerase erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des Telomerase PCR ELISA- Kits von Boehringer Mannheim. Folgende Chemikalien und Reagenzien sind in diesem Kit enthalten:

Lyse-Reagenz

Fertiglösung

Reaktionsmix

Fertiglösung, zweifach konzentriert, enthält :

Tris-Puffer

Telomerase-Substrat

P1-TS Primer, biotinmarkiert

P2-Primer

Nukleotide

Taq-Polymerase

Denaturierungsreagenz

Fertiglösung,

enthält Natriumhydroxid in einer Konzentration $<0,5\%$

Hybridisierungspuffer

Fertiglösung,

enthält eine DIG-markierte Nachweisprobe, komplementär zur Wiederholungssequenz der Telomeren

Waschpuffer

zehnfach konzentriert

Anti-DIG-POD

= Anti-DIG-Peroxidase, polyklonaler Antikörper vom Schaf, lyophilisiert, stabilisiert

Konjugations-Verdünnungspuffer

Fertiglösung

TMB-Substrat Lösung

Fertiglösung,

enthält das POD-Substrat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

Stop-Reagenz

Fertiglösung,

enthält weniger als 5% Schwefelsäure

Positivkontrolle

Zellextrakt, hergestellt aus 293 immortalisierten, telomeraseexprimierenden, menschlichen Nierenzellen, lyophilisiert

Mikrotiterplatte

Rahmen mit zwölf einzel entnehmbaren Streifen à acht Vertiefungen (Wells), streptavidinbeschichtet und nachhaltig mit Blockreagenz beschichtet

Schutzfolie

Selbstklebende Plastikfolie zum Schutz vor Verdunstung während der einzelnen Inkubationsschritte des ELISA-Protokolls

3.2 SONSTIGE MATERIALIEN

Probenmaterial

Bei den verwendeten Proben handelt es sich um Tumoranteile von Patienten mit einem Neuroblastom. Diese wurden aus ganz Deutschland in das Neuroblastomlabor eingeschickt, um dort im Rahmen der Studiengruppe der GPOH (German Society Pediatric Oncology and Hematology) Routinebestimmungen wie die MYCN-Amplifikation durchführen zu lassen.

Hilfsmittel

Skalpell
Petrischale
Kunststoffgefäß mit 0,5 – 1,5 ml Fassungsvermögen (z.B. Eppendorfhütchen)
Stößel
Pipetten
PCR-Cups
Multipette

3.3 GERÄTE

<u>ELISA:</u>	Dynex technologies mrx II
<u>PCR thermal cyclers:</u>	Perkin-Elmer GeneAmp 2400
<u>Wasserbad mit Schüttler:</u>	Julabo SW-20C
<u>Schüttler:</u>	IKA-Schüttler MTS 4
<u>Zentrifuge:</u>	eppendorf
<u>Vortex:</u>	Vortex Genie 2TM

4. METHODEN

4.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Mullis entwickelt und ist eine hervorragende Methode für die Herstellung großer Mengen eines speziellen DNA-Abschnittes mittels einer einfachen enzymatischen Reaktion (Mullis et al., 1986). Der eigentliche Fortschritt in der Etablierung dieser Methode besteht in ihrer hohen Selektivität und Spezifität, vor allem jedoch in einem relativ geringem Zeitaufwand. Arbeitsschritte, für die man Jahre zuvor noch Wochen oder Monate benötigte, sind jetzt in wenigen Stunden durchführbar.

Faszinierend für die Molekularbiologie ist die minimale Menge, die in einem Versuchsansatz Verwendung finden kann. Ein einziges Molekül genügt, um die Reaktion zu starten. Zudem muß die DNA nicht in reiner Form vorliegen: ein Zellysate ohne komplizierte und zeitaufwendige Reinigungsschritte ist vollkommen ausreichend.

4.1.1 RAHMENBEDINGUNGEN DER PCR

Trotzdem es sich bei der PCR um eine sehr komplexe Methode handelt, werden nur relativ wenig Materialien benötigt (Lachmund et al., 1994):

1. DNA- oder RNA-Matrize
2. Zwei Primer (Oligonukleotide)
3. Nukleotide (G,A,C,T)
4. Taq-Polymerase
5. geeignetes Puffersystem
6. Thermocycler

Der Gesamtansatz von 25-100 µl Volumen enthält 10 bis 100 pmol eines jeden Primers, 20 nmol eines jeden Nukleotides (Arnheim et al., 1992), 1-2,5 Units der TAQ-Polymerase und eine angepaßte Menge an Salzen und Puffern (Lachmund et al., 1994).

Primer

Man benötigt zwei verschiedene Primer mit einer definierten Basenfolge, die mittlerweile von mehreren Firmen zu beziehen sind. Sie müssen komplementär zu den flankierenden Abschnitten des gesuchten DNA-Fragmentes sein, wobei die Kenntnis der Sequenz dieses Fragments nicht zwingend notwendig ist. Die Primer dienen von beiden Seiten der Polymerase als Startpunkt für die DNA-Vermehrung.

Die Genauigkeit der Primerbindung an das zu amplifizierende Template hängt von der Temperatur und dem pH-Wert ab und muß für jedes Primerpaar im Zweifelsfall neu ausgetestet werden (Arnheim et al., 1992).

Die Sequenz der Primer sollte möglichst nur einmal im menschlichen Genom vorkommen, um eine Fehlpaarung zu vermeiden. Dies ist im Normalfall bei einer Länge von mindestens 18 Basen gewährleistet. Die notwendige Zeit für die Hybridisierung mit dem Matrizenstrang nimmt mit steigender Anzahl an Basen zu, daher sollten die Primer die Mindestlänge nicht unnötig überschreiten (Lachmund et al., 1994).

Nukleotide

Die Nukleotide als Bausteine der DNA liegen als Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) vor und müssen in ausreichender Menge vorhanden sein, um die Polymerase zu sättigen. Sie sollten jedoch nicht übermäßig oder in unterschiedlicher Konzentration vorliegen, um Fehlpaarungen zu vermeiden (Lachmund et al., 1994).

Taq-Polymerase

Sie ist das Schlüsselenzym der Reaktion und aufgrund ihrer geringen Fehlerrate optimal geeignet für die naturgetreue Kopie der DNA. Für ihre bedeutungsvolle Aufgabe benötigt sie einen Matrizenstrang, an dem sie sich orientiert, um den komplementären Strang aufzubauen und Primer, an denen sie starten kann. Sie ist hitzeresistent, jedoch nur begrenzt stabil (Lachmund et al., 1994).

Ein großer Teil der Geschwindigkeit der Methode ist diesem Enzym zu verdanken, das Sequenzen mit bis zu 1000 Basen pro Minute herstellen kann (Arnheim et al., 1992).

Puffersystem

Der pH-Wert im Reaktionsansatz hat im basischen Bereich sein Optimum (~ 8,8) und muß eingehalten werden, da das Enzym sonst frühzeitig inaktiviert wird (Lachmund et al., 1994).

Thermo-Cycler

Es gibt eine Reihe von Thermocyclern auf dem Markt, deren wichtigster Unterschied darin besteht, die verschiedenen Temperaturen mittels eines Wasserbades oder eines Wärmeblocks zu erzeugen, wobei letzterer weniger Schwankungen aufweist (Lachmund et al., 1994).

4.1.2 PRINZIP DER PCR

Das Prinzip der PCR ist einfach und beruht auf der bekannten Struktur der DNA, auf dem Wissen um die DNA-Replikation und der daran beteiligten Enzyme und „Bausteine“. In Anlehnung an den natürlichen Ablauf der DNA-Vermehrung gliedert sich die PCR in drei Teilschritte, die in einer bestimmten Anzahl von Zyklen wiederholt werden (Lachmund et al., 1994).

Von besonderer Bedeutung hierbei ist die richtige Wahl der PCR-Bedingungen:

Die optimale Temperatur für jeden einzelnen Teilschritt, Zugabe einer ausreichenden Menge an den benötigten Substanzen und die richtige Anzahl der Zyklen, die von der Ausgangskonzentration der Matrize abhängig ist.

Im Regelfall handelt es sich um 25-30 Zyklen, wobei die Teilschritte jeweils verschiedene Zeiten und unterschiedliche Temperaturen benötigen. Für diesen Zweck ist der Thermo-Cycler programmierbar, heizt und kühlt somit automatisch auf die geforderte Temperatur und inkubiert den Reaktionsansatz für die benötigte Zeit ((Lachmund et al., 1994; Arnheim et al., 1992).

1. Denaturierung der DNA

Ausgehend vom ersten Schritt der natürlichen Polymerisation muß zunächst die Doppelhelixstruktur der DNA aufgespalten werden, so daß am Ende zwei Einzelstränge vorliegen.

Diese Aufspaltung der DNA erfolgt durch einfache Hitzebehandlung bei ca. 90-96°C für 30-60 Sekunden.

2. Annealing/Hybridisierung

Bei 50-60°C werden nun die Primer an die ihnen komplementäre Stelle des DNA-Stranges angelagert, wo sie der TAQ-Polymerase als Startpunkt dienen. Dieser Schritt dauert ungefähr eine Minute und wird als Annealing bezeichnet.

3. Polymerisation

Dieser Schritt benötigt ungefähr eine Minute bei einer Temperatur von 72°C.

Die Polymerase erkennt die Primer und beginnt mit der Synthese des Gegenstranges am 3'-OH-Ende. Dieser Vorgang spielt sich an beiden Strängen gleichzeitig ab, so daß wir am Ende dieses Schrittes zwei Doppelstränge vorliegen haben. Jeder dieser beiden Stränge beginnt an einem der Enden mit der Primersequenz und läuft am anderen Ende offen aus.

Zu Beginn des nächsten Zyklus werden diese beiden Doppelstränge dann denaturiert, so daß jetzt vier Einzelstränge für die Polymerase als Matrize zur Verfügung stehen. Erforderlich hierbei ist natürlich, daß das Template weit genug über die eigentliche Sequenz verlängert wird, so daß der Primer auf der anderen Seite wieder ansetzen kann.

An den im ersten Zyklus entstandenen offenen Enden setzt nun wieder ein Primer an und die Polymerisation läuft nun bis zum Ende durch, an dem der andere Primer im vorangehenden Zyklus begonnen hat. Dieser Abschnitt mit definierter Länge unterliegt im Gegensatz zu dem mit offenem Ende einem exponentiellen Wachstum. Nach den ersten Zyklen ist das Hauptprodukt ein DNA-Produkt, das exakt so lang ist wie der gewünschte DNA-Abschnitt plus der beiden Primer. In dieser exponentiellen Vermehrung liegt das Geheimnis der Geschwindigkeit dieser Methode. Jeder erzeugte Doppelstrang dient im folgenden Zyklus selber als Matrize.

Trotz aller Optimierungsmöglichkeiten erreicht die Effizienz dieser Methode keine 100%: Die Zahl der Amplifikationen nimmt mit zunehmender Anzahl der Zyklen ab. Man erreicht ein Plateau, welches durch zwei Phänomene erklärt werden kann:

Zum einen kommt es bei steigender Zahl der Doppelstränge zu einer Konkurrenz zwischen Annealing von Template und Primer und einem Reannealing der komplementären Stränge.

Zum anderen reicht irgendwann die Enzymmenge nicht mehr aus, die Primer-Template-komplexe in der zur Verfügung stehenden Zeit zu verlängern (Arnheim et al., 1992).

4.1.3 ERGEBNIS DER PCR

Das PCR-Produkt kann im Anschluß mit einem Agarosegel nachgewiesen werden. Es tritt hier als scharfe Bande bei entsprechender Länge auf. Weitere unscharfe Banden weisen auf Verunreinigungen mit Fremd-DNA und auf unspezifische Nebenprodukte hin und bieten somit eine Kontrolle für die Qualität der PCR.

Der Rest des Produktes kann nun in weiteren Versuchen Verwendung finden.

4.2 ELISA

Der ELISA zählt zu den Enzymimmunassays und ist eine geeignete Methode zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen oder an diese gekoppelte Substanzen in einer Probe. Aufgrund der problem- und gefahrlosen Durchführung findet er immer mehr Anwendung in den Labors der verschiedensten Bereiche (Kemeny, 1994).

4.2.1 GRUNDLAGE DER IMMUNASSAYS

Bei den Immunassays unterscheidet man verschiedene Techniken, die sich jedoch alle das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze machen. Man faßt unter ihnen die einfachen Tests wie die Präzipitation, die Agglutination, die Immunelektrophorese und die komplexeren Tests, wie den Radioimmunassay (RIA) und den Enzymimmunassay (EIA), deren Empfindlichkeit um etwa ein Tausendfaches größer ist, zusammen. Den EIA unterteilt man weiterhin in einen homologen und einen heterologen, der als ELISA (enzyme linked immunsorbent assay) bezeichnet wird.

Im Gegensatz zum homologen EIA, bei dem die Antigen-Antikörper-Bindung bereits das Signal ergibt, müssen beim Heterologen die freien Antikörper der Probe von den gebundenen getrennt werden, da die Nachweisreaktion auf alle Antikörper anspricht (Thomas, 1988).

4.2.2 FUNKTIONSWEISE DES ELISA

Auch die ELISA-Technik weist verschiedene Varianten auf. So spielen die Art der Probe, die zur Verfügung stehenden Reagenzien und vor allem der gewünschte Umfang des Ergebnisses eine große Rolle bei der Auswahl des richtigen ELISA-Protokolls.

Bei den Ergebnissen reicht die Differenzierung von einfachen Aussagen zwischen Positiv und Negativ bis hin zu exakten Angaben der Konzentrationsunterschiede.

Man kennt zum einen die nicht-kompetitiven sogenannten Sandwich-ELISAs und die kompetitiven ELISAs, die die Bestimmung der genauen Menge des Antigens oder Antikörpers ermöglichen.

Weiterhin gibt es In-Situ-Methoden, auf die ich hier nicht weiter eingehen möchte.

Da die Durchführung der verschiedenen Varianten auf dem gleichen Prinzip beruht, soll es hier kurz erläutert werden (Kemeny, 1994):

Die nachzuweisende Substanz muß zu Beginn des Versuches immobilisiert werden, was durch Bindung an eine Festphase erfolgt. Verwendung hierfür finden beispielsweise Mikrotiterplatten, die bereits mit einem spezifischen Antikörper oder Antigen beschichtet sind und so das gesuchte Molekül fixieren können.

Da für eine solche Beschichtung allerdings nicht immer Antigen oder Antikörper in geeigneter Form vorliegen, ist es möglich, für die Bindung Reagenzien einzusetzen, die gezielt ein vorher gekennzeichnetes Molekül fixieren. Ein solches Reagenz ist das Streptavidin, das in dieser Arbeit verwendet wurde.

Für die Anlagerung an eine Streptavidinbeschichtung ist die Markierung des gewünschten Moleküls mit Biotin notwendig, was durch die Verwendung biotinmarkierter Primer in der PCR erreicht werden kann.

Die Verwendung von Mikrotiterplatten gewährleistet die Bedingungen des Reagenzüberschusses und garantiert so eine hohe Präzision der Methode.

Die präparierten Platten binden die gesuchte Substanz in einer Inkubationsphase, in der die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet. Der Überschuß an Reagenz und Probe wird anschließend in einem Waschvorgang entfernt.

Im einem weiteren Schritt wird den Versuchsansätzen ein spezifischer enzymmarkierter Detektor hinzugesetzt, der sich an den Antigen-Antikörper-Komplex anlagert.

Bei den Immunassays sind solche Detektoren spezielle Moleküle, die Spezifität für die Probe besitzen. Verwendung finden Anti-Antikörper oder auch Antikörper gegen eine bestimmte Substanz, die spezifisch an die nachzuweisende Probe gelagert wird. Beispielsweise kann einsträngige DNA, deren Sequenz zumindest teilweise bekannt ist, mit einem passenden DIG-markierten Oligonukleotid hybridisiert und so nachweisbar für einen Antikörper gegen DIG werden.

Für die Enzymmarkierung stehen Peroxidase, alkalische Phosphatase und beta-D-Galaktosidase zur Verfügung. Wie bei anderen Enzymen muß auch bei ihrer Anwendung peinlich genau auf die Rahmenbedingungen wie pH und Temperatur geachtet werden, um die optimale Enzymaktivität zu erhalten. Wichtig ist die Probe mäßig in Bewegung zu halten, damit es nicht zu einer lokalen Verarmung an Substrat kommt.

Der enzymtragende Detektor bindet an die Probe und muß im Folgenden über die Aktivität seines gebundenen Enzyms sichtbar gemacht werden. Dies geschieht unter Zuhilfenahme eines chromogenen Substrates, welches bei Anwesenheit des Enzyms eine Farbänderung erfährt, die nach definierter Zeit mit einem geeigneten Reagenz abgestoppt wird.

Hierbei muß bei allen Proben exakt die gleiche Zeit eingehalten werden, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Die Farbintensität wird durch photometrische Messung mit einem ELISA-Readers ermittelt.

Die Geschwindigkeit der Farbentwicklung ist bei den verschiedenen Enzymen unterschiedlich und hängt teilweise von den verwendeten Chromogenen ab, die auf die Enzyme abgestimmt werden sollten. Als Chromogene stehen zur Verfügung:

Tetramethylbenzidin, Aminosalicylsäure, Methylbenzothiazolinhydrazon und andere.

4.2.3 ERGEBNIS DES ELISA

Wie oben bereits erwähnt, reicht für viele qualitative Untersuchungen, wie auch in unserem Fall, die Frage nach Farbentwicklung und damit nach positivem oder negativem Ergebnis aus. Bei Bedarf quantitativer Ergebnisse ist das Mitführen einer Referenzkurve notwendig, da das Verhältnis zwischen der gebildeten Farbe und der Konzentration der Probe selten linear ist. Sehr hilfreich hierbei ist die bei dem Plattenleser mitzuerwerbende Software, die für einen Großteil der Statistik verwendet werden kann.

4.3 TELOMERASE PCR-ELISA

Aufgrund der Seltenheit von Telomerase in Zellen (schätzungsweise 200 Kopien pro Zelle) war der Nachweis von Telomeraseexpression in menschlichen Tumorbiopsien lange quasi unmöglich. Der Durchbruch kam 1994, als Kim et al. eine hochsensitive Methode entwickelten, die es ermöglichte, Telomeraseaktivität in einem Zellextrakt mit minimal 0,01% telomeraseexprimierenden Zellen nachzuweisen. Dieses ‚Telomeric repeat amplification protocol‘, kurz genannt TRAP, verbindet die biochemischen Merkmale der Telomerase mit einer Nukleinsäureamplifikation wie der PCR (Kim et al., 1994).

Zu einem Zellextrakt aus lysierten Zellen werden Nukleotidtriphosphate und Primer mit der Basenfolge eines Telomers hinzugefügt. Bei Anwesenheit von Telomerase kommt es zur Verlängerung des Primers. Diese Extensionsprodukte können anschließend mittels der PCR vervielfältigt und im Anschluß beispielsweise durch Auftragen auf ein Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Da das Original einige technische Schwierigkeiten für das Massenscreening wie die Verwendung von Gel-Elektrophorese mit radioaktiv-markierten Materialien aufweist, wurde es schon einige Male modifiziert, um es schneller und einfacher zu machen. Eine der neueren Varianten ist der in dieser Arbeit verwendete Nachweis der Amplifikationsprodukte mit Hilfe eines ELISA-Protokolls.

4.3.1 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN AUS DEM KIT

Das gesamte Kit wird bei -20°C gelagert und muß vor Gebrauch aufgetaut werden.

Lyse-Reagenz

Das Lyse-Reagenz kann nach dem Auftauen direkt verwendet werden.

Reaktionsmix

Dieser zweifach konzentrierte Mix verbindet die Reagenzien für zwei Schritte in einer Lösung: für die Primerverlängerung durch die Telomerase und die anschließende Amplifikation mittels der PCR. Das Reagenz wird auf Eis langsam aufgetaut und in kleinere Mengen aufgeteilt, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, falls es nicht sofort komplett aufgebraucht wird.

Denaturierungsreagenz

Dieses Reagenz kann nach dem Auftauen sofort eingesetzt werden

Hybridisierungspuffer

Das Reagenz wird langsam auf Eis aufgetaut und ebenfalls in kleinere Portionen aufgeteilt, um unnötiges Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.

Waschlösung

Da der Waschpuffer zehnfach konzentriert ist muß die benötigte Menge nach dem Auftauen 1:10 mit autoklaviertem destilliertem Wasser verdünnt werden.

Anti-DIG-POD

Diese Lyophilisat wird mit 240 µl autoklaviertem destilliertem Wasser aufgelöst. Daraus ergibt sich eine Konzentration von Antikörper-Konjugat von 0,5 U/ ml.

Anschließend darf das Reagenz nicht mehr eingefroren werden, sondern sollte bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Konjugationsverdünnungspuffer

Der Puffer kann nach dem Auftauen direkt verwendet werden.

TMB-Substrat

Das Substrat kann wie geliefert verwendet werden, es muß vor Gebrauch auf Raumtemperatur aufgewärmt werden.

Stop-Reagenz

Das Reagenz kann direkt nach dem Auftauen verwendet werden.

Positivkontrolle

siehe unter „Kontrollenvorbereitung“

4.3.2 GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER GEWEBEEXTRAKTE

Bei den Gewebeproben handelt es sich um Biopsien von Neuroblastomen, die von Patienten aus ganz Deutschland bei Operationen gewonnen wurden. Diese werden bei -80°C gelagert und erst direkt vor Beginn der Aufbereitung entnommen. Dieses tiefgefrorene Material wurde mit Hilfe eines Skalpells auf einer Petrischale in möglichst dünne Scheiben geschnitten, da kein Mikrotom zur Verfügung stand, und sofort in ein Kunststoffgefäß mit 200 µl Lyse-Reagenz gegeben. Auf Eis gelagert muß das Gemisch mittels eines Stößels homogenisiert werden.

Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis, in der die Tumorzellen durch den Lysepuffer zerstört werden. Auf diese Weise gelangen die Plasmabestandteile, unter anderem auch die Telomerase in Lösung. Eine anschließende Zentrifugation der Lysate bei 16.000 Umdrehungen für 20 Minuten bei 4°C führt zum Absetzen der Zelltrümmer am Gefäßboden. Der so gewonnene Überstand von ca. 175 µl wird in ein frisches Gefäß transferiert und weiterhin auf Eis kühl gehalten.

Wichtig bei diesem gesamten Vorgehen ist, die Proben so kühl wie möglich zu halten und mit Handschuhen und sauberen Geräten zu arbeiten, um jegliche Verunreinigungen zu vermeiden.

4.3.3 KONTROLLENVORBEREITUNG

Negativkontrolle

Zur Herstellung einer negativen Kontrolle wurde ein Teil eines Überstandes einer aufbereiteten Proben entnommen und 10 Minuten bei 65°C im Wasserbad erwärmt. Hierbei kommt es zu einer vollständigen Zerstörung der Telomeraseaktivität und dementsprechend zu einem negativen Ergebnis bei der Auswertung des Versuchs. Man setzt 1-3 µl der negativen Kontrolle in die PCR ein und führt sie in den folgenden Schritten wie eine normale Probe mit.

Positivkontrolle

Hierbei handelt es sich um eine von der Firma Boehringer mitgelieferte Kontrolle, die aus menschlichen Nierenzellen hergestellt wurde, die Telomerase exprimieren. Das lyophilisierte Zellextrakt wird auf Eis mit 20 µl sterilem destilliertem Wasser resuspendiert, wobei eine Konzentration von 10^3 Zelläquivalenten pro µl entsteht. 1-3 µl dieser Lösung werden in die PCR eingesetzt und ebenso wie alle anderen Proben im weiteren Verlauf des Versuchs behandelt.

4.3.4 TRAP: TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL

Das Protokoll umfaßt die Verlängerung des Primers durch die Telomerase und die anschließende Amplifikation der spezifischen Nukleotidsequenzen mittels der PCR.

Arbeitsanleitung

Während des gesamten Vorganges muß auf Eis gearbeitet werden.

Pro Ansatz werden 25 µl des Reaktionsmixes in ein PCR-Gefäß pipettiert und 1-3 µl des Zellextraktes dazugegeben. Anschließend füllt man den Reaktionsansatz bis zu einer Gesamtmenge von 50 µl mit sterilem Aqua destillata auf.

Die Gefäße werden nun in einen Thermocycler gestellt, wo die folgenden Zyklen automatisch durchlaufen werden:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklus
1. Primerverlängerung	10-30 min	25°C	1
2. Inaktivierung der Telomerase	5 min	94°C	2
3. Amplifikation			3-32
a. Denaturierung	30 sec	94°C	
b. Annealing	30 sec	50°C	
c. Polymerisation	90 sec	72°C	
	10 min	72°C	33
4. Hold		4°C	

Primerverlängerung

In diesem ersten Schritt fügt die Telomerase an das 3'Ende des biotinmarkierten P1-TS-Primer die für sie charakteristischen Sequenzen an. Je höher ihre Konzentration ist, desto mehr Primer werden beansprucht und desto mehr Sequenzen werden produziert.

Inaktivierung der Telomerase

Nach der Primerverlängerung wird die Telomerase mittels Hitzeeinwirkung denaturiert.

Amplifikation

Nach den ersten beiden Schritten liegt ein einsträngiger DNA-Abschnitt vor, der aus dem P1-TS-Primer und zahlreichen Wiederholungen der für die Telomerase spezifischen sechs Nukleotide besteht.

An diesen Strang lagert sich nun ein zweiter Primer P2 an, der komplementär zu der Wiederholungssequenz ist. Er dient der TAQ-Polymerase als Startpunkt für ihre Neusynthese, die zu einem Doppelstrang führt.

Während der weiteren PCR dienen beide Primer der TAQ-Polymerase zur Amplifizierung der charakteristischen Sequenzen. Je größer die Ausgangssubstanz zu Beginn der PCR, desto größer die Ausbeute.

4.3.5 ELISA-PROTOKOLL

Ausgangssubstanz für den ELISA sind die PCR-Produkte, die als Doppelstränge in der Probe vorliegen. Für ihren Nachweis ist eine Markierung notwendig. Diese erfolgt mit Hilfe eines digoxigeninmarkierten Oligonukleotids, das als Detektor dient, und eines gegen das

Digoxigenin gerichteten Antikörpers. Dieses Oligonukleotid ist komplementär zur telomerase-spezifischen Sequenz.

Die Doppelstränge müssen zunächst in Einzelstränge überführt werden um eine Hybridisierung mit dem markierten Molekül zu ermöglichen.

Im Anschluß daran erfolgt die Immobilisierung der Probe mittels des biotinmarkierten Primers an einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte.

Es folgt die Zugabe des markierten Anti-DIG-Antikörpers, der wiederum mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Die Enzymaktivität wird dann mittels einer Farbreaktion nachgewiesen. TMB dient der Peroxidase als Substrat und entwickelt eine blaue Farbe, wenn es umgesetzt wird. Bei Zugabe des Stop-Reagenz schlägt die Farbe in gelb um. Die Menge des Farbproduktes ist proportional zu der Menge von hybridisiertem markiertem Oligonukleotid.

ARBEITSANLEITUNG

Hybridisierung

Man gibt 20 µl des Denaturierungsreagenz in ein Eppendorfgefäß und pipettiert 5 µl des PCR-Produktes dazu. Nun folgt eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Anschließend werden 225 µl des Hybridisierungspuffer zu jedem Ansatz hinzugefügt und kurz mit dem Vortexer gemischt.

Die Proben werden dann in einem Wasserbad mit einer Schüttelvorrichtung bei 37°C und 300 Umdrehungen pro Minute für zwei Stunden inkubiert.

Im Anschluß daran pipettiert man die Proben in die Mikrotiterplatte (siehe Abbildung 4), deckt diese mit einer Schutzhülle ab. Es folgt eine erneute Inkubation für eine Stunde auf einem Schüttler.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	P6	P14	P22	P30	P38	Blank	P6	P14	P22	P30	P38
B	Pos.	P7	P15	P23	P31	P39	Pos.	P7	P15	P23	P31	P39
C	Neg.	P8	P16	P24	P32	P40	Neg.	P8	P16	P24	P32	P40
D	P1	P9	P17	P25	P33	P41	P1	P9	P17	P25	P33	P41
E	P2	P10	P18	P26	P34	P42	P2	P10	P18	P26	P34	P42
F	P3	P11	P19	P27	P35	P43	P3	P11	P19	P27	P35	P43
G	P4	P12	P20	P28	P36	P44	P4	P12	P20	P28	P36	P44
H	P5	P13	P21	P29	P37	P45	P5	P13	P21	P29	P37	P45

ABB. 4: EINTEILUNG EINER MIKROTITERPLATTE

Waschen der Probe

Nach diesem Abschnitt des Protokolls muß die Probe gewaschen werden, um die Reagenzien sorgfältig zu entfernen und so falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Dies geschieht mit Hilfe einer Multipette. Zunächst wird der Hybridisierungspuffer aus der Mikrotiterplatte entfernt und dann jedes Well mit 250 µl des Waschpuffers gefüllt.

Nun schwenkt man die Platte vorsichtig ca. 30 Sekunden mit der Hand und entleert die Waschlösung wieder. Der Waschvorgang wird insgesamt dreimal wiederholt.

Markierung mit dem Anti-DIG-POD

Die Lösung darf erst direkt vor ihrer Anwendung verdünnt werden, da sie nicht gelagert werden kann. Man verdünnt das Anti-Dig-POD 1:50 mit dem Konjugationsverdünnungspuffer, um eine endgültige Konzentration von 10 mU/ml zu erhalten. Es folgt eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

Farbreaktion und Messung mit ELISA

Nun folgt zunächst wieder ein Waschschrift, der diesmal fünfmal wiederholt wird, sich aber ansonsten nicht von dem Vorhergehenden unterscheidet.

Im Anschluß daran pipettiert man in jedes Well 100 µl der TMB-Lösung, die Raumtemperatur haben muß. Dieser Schritt muß in einem möglichst dunklen Raum durchgeführt werden, da TMB lichtempfindlich ist. Aus diesem Grund sollte man die Mikrotiterplatte auch bei der folgenden Inkubation lichtgeschützt halten.

Die Proben werden nun 20 Minuten auf einem Schüttler mit ca. 300 Umdrehungen bei Raumtemperatur inkubiert. Im Laufe dieser Zeit entwickeln sich die Proben mit Telomeraseaktivität eine blaue Farbe.

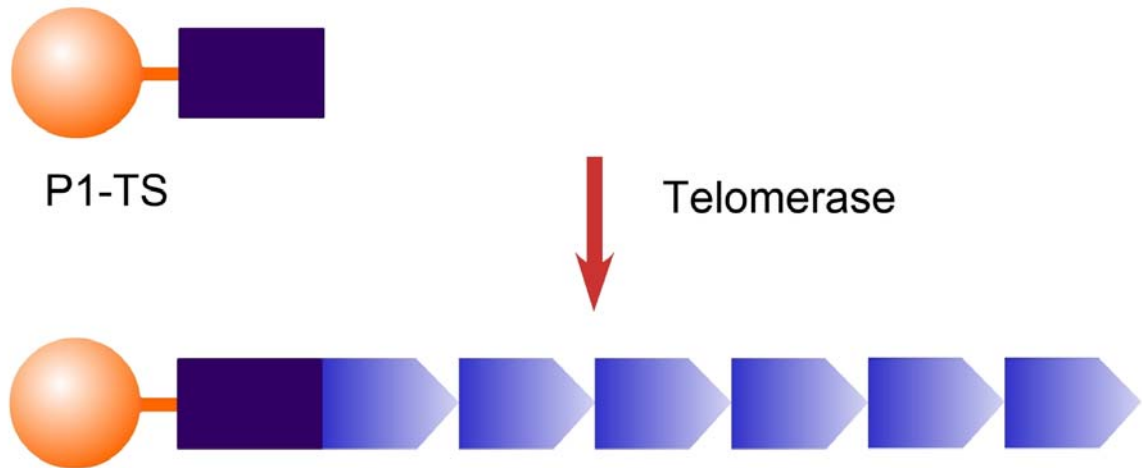
Nach exakt 20 Minuten erfolgt das Abstoppen der Reaktion mit 100 µl Stop-Reagenz pro Well und zwar genau in der Reihenfolge, in der die Reaktion auch gestartet wurde. Beim Zugeben des Stop-Reagenzes wird der zunächst blaue Farbstoff in einen gelben, spektroskopisch detektierbaren Farbstoff umgewandelt.

Innerhalb von 30 Minuten nach Abstoppen der Reaktion sollte die Platte mit einem ELISA-Gerät bei 450 nm Wellenlänge bei einer Referenz von 690 nm gemessen werden.

Gemessen wird die Extinktion der Probe und das Ergebnis anschließend in OD angegeben. Der gemessene Leerwert wird automatisch bei allen Ergebnissen abgezogen, so daß die angegebenen Werte bereits als endgültig betrachtet werden können. Ihre Bearbeitung und Verwertung kann direkt im Anschluß vorgenommen werden.

4.3.6 DAS PRINZIP DES TELOMERASE-PCR-ELISA

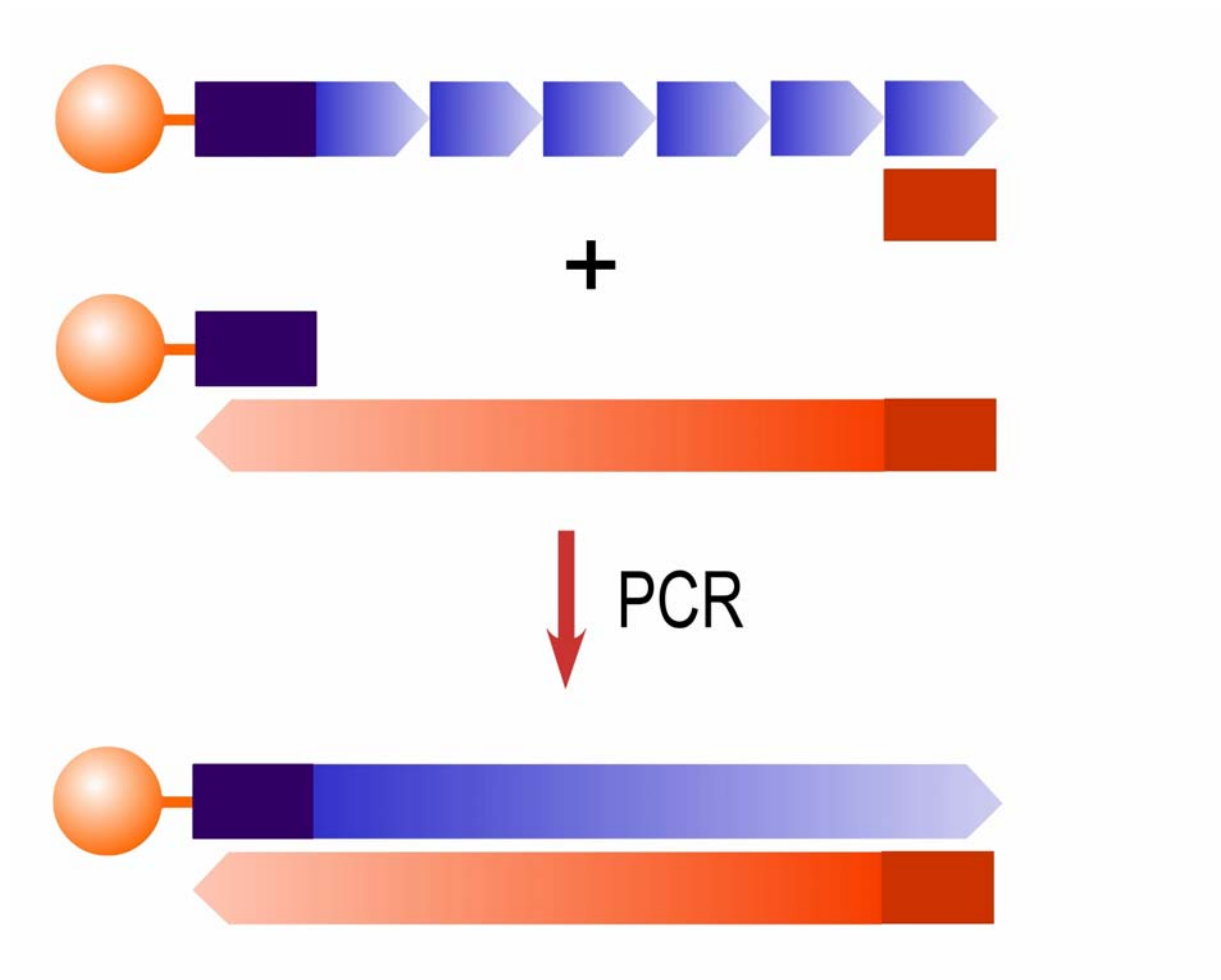
(aus Informationsbroschüre der Firma boehringer mannheim für Telomerase-PCR-ELISA)



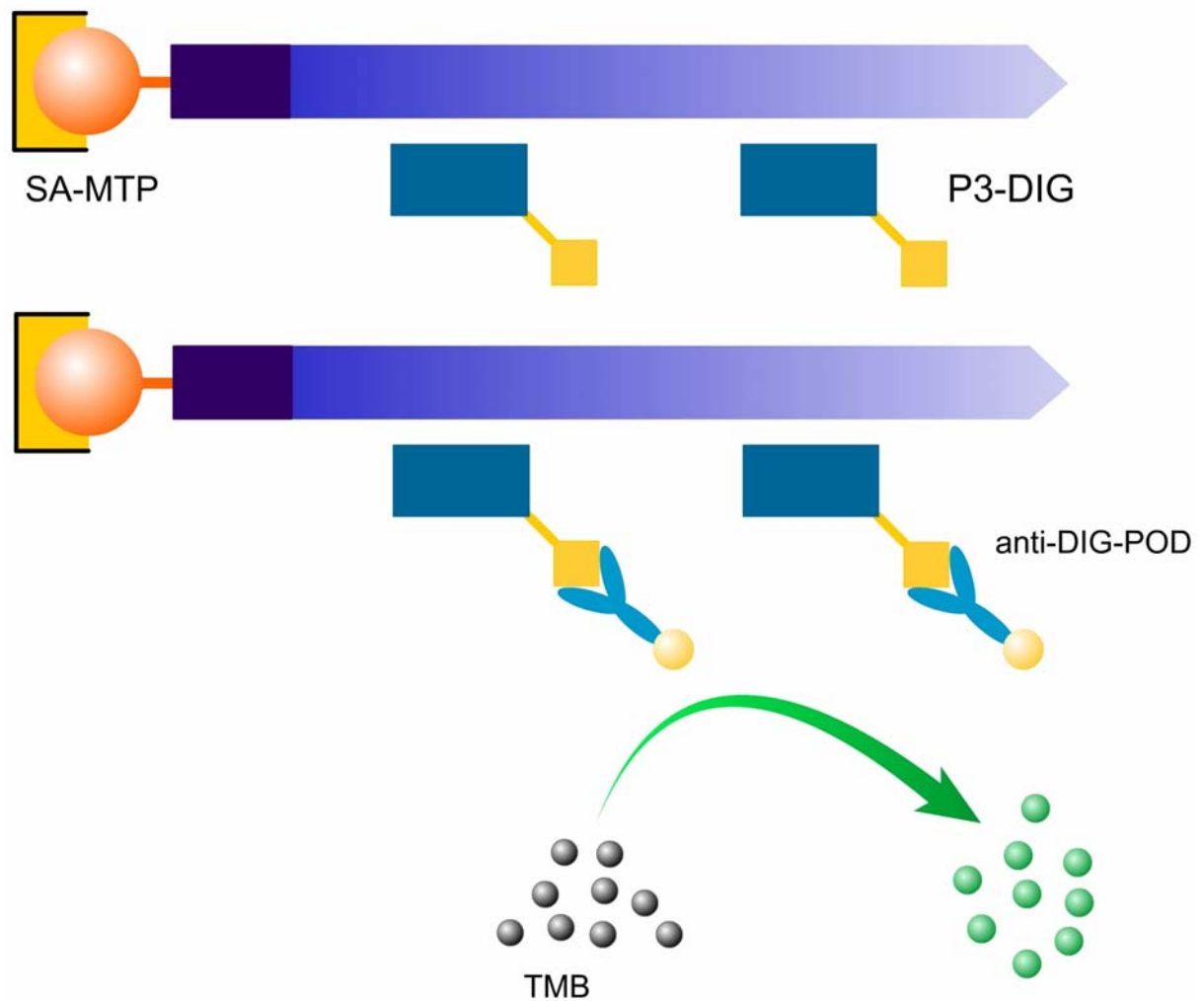
SCHRITT 1: Die Telomerase fügt an den biotinmarkierten 3'Primer die spezifische sechs Nukleotide umfassende Sequenz der Telomeren an.
Je höher die Aktivität bzw. die Anzahl der Telomerase-Enzyme, desto größer die Anzahl der Wiederholungen.



SCHRITT 2: Ein zweiter Primer, der komplementär zu den telomerischen Sequenzen ist, hybridisiert mit den neu-synthetisierten Abschnitten.
Mit seiner Hilfe bildet die TAQ-Polymerase einen komplementären Strang.



SCHRITT 3: Während der PCR werden die neu-synthetisierten Doppelstränge immer wieder denaturiert, so daß die Primer erneut an die Einzelstränge binden können und die Polymerase diese wieder komplementiert. Nach jedem Zyklus liegen so doppelt so viele telomerase-spezifische Sequenzen vor wie zu Beginn des Zyklus.



SCHRITT 4: Das PCR-Produkt wird denaturiert und mit einem digoxigenin-markiertem Oligonukleotid hybridisiert, welches komplementär zu den charakteristischen Sequenzen ist.
Mittels des biotinmarkierten Primers wird die Probe zum Nachweis im ELISA an eine Mikrotiterplatte fixiert.
Ein mit Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Digoxigenin bindet an das Oligonukleotid. Die Peroxidase setzt das Substrat TMB um, was durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht wird, die im ELISA-Reader gemessen werden kann.
Die Menge des Substratumsatzes korreliert mit der Menge des gebundenen DIG-markierten Oligonukleotids.

4.3.7 AUSWERTUNG DER MEßWERTE

4.3.7.1 BEURTEILUNG DER KONTROLLEN

Die Kontrolle der Meßergebnisse erfolgte auf verschiedene Weise. Zum einen wurden auf jeder Platte ein Leerwert, eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt.

Weiterhin wurden vergleichende Kontrollen auf denselben Platten aber auch auf unterschiedlichen Platten durchgeführt (Intra- und Inter-Assay-Kontrollen), um die Schwankungsbreite gleicher Proben zu ermitteln und so festzustellen, ob die Ergebnisse verlässlich wiederholbar sind.

Nach Erhalt der Ergebnisse werden zunächst Leerwert, sowie Positiv- und Negativkontrolle beurteilt, um sich ein Bild über die Verlässlichkeit des Versuches zu schaffen.

Leerwert

Dieser dient dem Ausschluß etwaiger Verunreinigungen, die einen Einfluß auf die Farbreaktion haben könnten und um die minimale Eigenextinktion der Reagenzien von dem eigentlichen Ergebnis abzuziehen.

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle dient dem Ausschluß einer Verunreinigung, die eine falsch–hohe Telomeraseaktivität vortäuscht. Diese Kontrolle enthält bei richtiger Vorbereitung keine Telomerase und darf daher nicht mehr als 0,25 OD aufweisen. Ist sie höher als dieser Grenzwert muß der gesamte Assay inklusive PCR wiederholt werden.

Positivkontrolle

Die Positivkontrolle dient dem Nachweis einer, die Telomeraseaktivität beeinträchtigenden Substanz, wie RNase, die ein falsch-niedriges Ergebnis vortäuscht. Die Positivkontrolle ist im Kit enthalten und weist sicher Telomeraseaktivität auf.

Nach einer Farbreaktion von 20 Minuten und einer eingesetzten Menge von 10^3 Zelläquivalenten sollte das Ergebnis 1,5 OD nicht unterschreiten. Andernfalls muß auch hier das gesamte Experiment wiederholt werden.

Intra-Assay-Kontrolle

Auf ein und derselben Platte werden Doppelbestimmungen von den Patientenproben und Positiv- sowie Negativkontrollen durchgeführt und darauf geachtet, daß die zwei Wells mit der gleichen Probe voneinander entfernt liegen.

Diese Art der Kontrolle ging in allen Messungen mit nahezu identischen Werten einher.

Inter-Assay-Kontrolle

Die Proben wurden auch an verschiedenen Tagen auf verschiedenen Platten getestet.

Hierbei erwiesen sich die Schwankungen der gleichen Proben als höher wie bei der Intra-Assay-Kontrolle. Im Vergleich mit der Positivkontrolle jedoch, die im gleichen Maße variierte, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Um die Verlässlichkeit der Messungen noch weiter zu prüfen wurde von dem Patient 21 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Telomerase isoliert, wobei sich kein Unterschied im Ergebnis feststellen ließ.

Weiterhin wurden von ca. der Hälfte der Proben eine zweite PCR gemacht. Auch hier ließ sich kein gravierender Unterschied in den Werten verzeichnen.

4.3.7.2 BEARBEITUNG DER ROHWERTE

Von dem OD-Wert einer jeden Probe wird der Wert der Negativkontrolle abgezogen. Man betrachtet danach alle Werte $> 0,200$ als positiv.

In unserem Fall handelt es sich um einen qualitativen ELISA, die reinen OD-Werte sind für die Auswertung ausreichend, da es nur bei Anwesenheit der Telomerase zu einem positiven Ergebnis kommt.

Im Laufe der verschiedenen Messungen fiel auf, daß die Proben mit nachweisbarer Telomeraseaktivität in zwei Gruppen aufzuteilen waren: in solche mit grenzwertig erhöhter, die zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse zu den Tumoren ohne Telomeraseaktivität gerechnet wurden, und in solche mit stark erhöhter Telomeraseaktivität. Wichtig hierbei war die Beurteilung des Wertes in Zusammenhang mit der Positivkontrolle, die in einem Bereich von 1,5 – 2,5 schwankte und so in Beziehung zu der Höhe des gemessenen Wertes gesetzt werden mußte.

Da das Kit von der Firma Boehringer Mannheim zu beziehen ist, konnte man davon ausgehen, daß keine großen Konzentrationsschwankungen der Reagenzien auftreten. So ist bei sorgfältigem Arbeiten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegeben.

5. ERGEBNISSE

5.1 DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

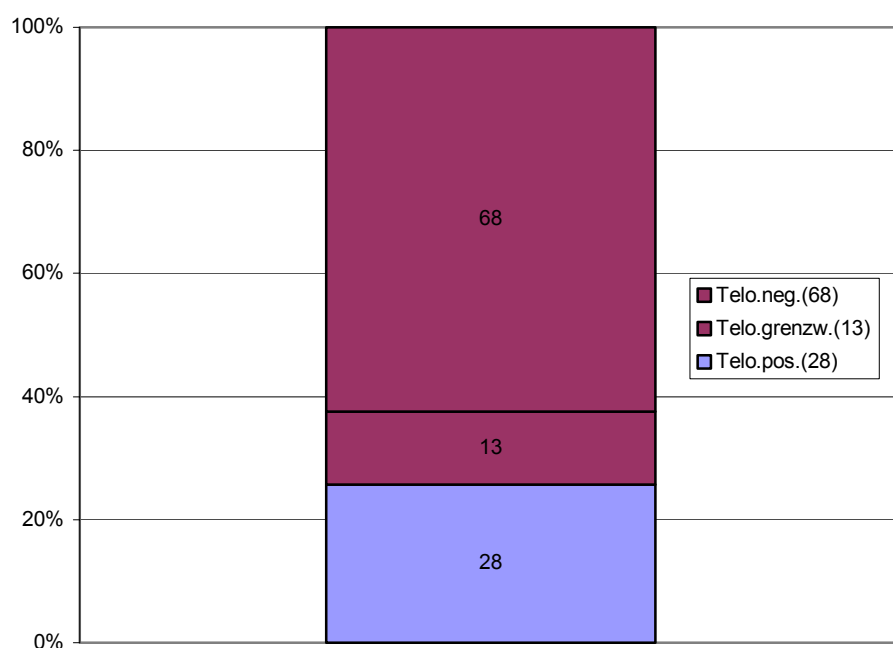
5.1.1 TELOMERASEAKTIVITÄT IN 109 HUMANEN NEUROBLASTOMEN

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine qualitative Untersuchung von 109 Neuroblastomen mit dem Ziel, diese auf vorhandene oder fehlende Telomeraseaktivität zu testen. Grundlage für eine solche Aussage sind die Ergebnisse des ELISA, welche in optischer Dichte (OD) angegeben werden. Die Spanne der Ergebnisse reicht von 0,0 bis 2,5 OD. Von einem positiven Ergebnis (nach Abzug des Wertes der Negativkontrolle) ist bei einem Wert von mehr als 0,2 OD auszugehen.

Die Messung der Telomeraseaktivität ergab bei 28 (25,7%) der 109 untersuchten Neuroblastome einen eindeutigen Aktivitätsnachweis, bei 68 (62,4%) Tumoren hingegen konnte eine solche Aktivität nicht nachgewiesen werden.

Die verbliebenen 13 (11,9%) Neuroblastome konnten weder der Gruppe mit fehlender noch der Gruppe mit nachweisbarer Telomeraseaktivität eindeutig zugeordnet werden. Sie befinden sich in einem Bereich um 0,2 OD und liegen damit (auch in mehreren Kontrollmessungen) knapp unter bzw. über der Grenze zwischen vorhandener oder fehlender Aktivität des Enzyms. Um die Aussage dieser Arbeit nicht durch falsch positive Ergebnisse zu beeinflussen, wurden diese 13 „Grenzwertigen“ zu der Gruppe derer mit negativer Telomeraseaktivität gerechnet. Für diese Gruppe der Tumoren ohne Nachweis von Telomerase ergibt sich im Folgenden eine Anzahl von 81 Patienten.

ABB. 4: TELOMERASEAKTIVITÄT IN 109 NEUROBLASTOMEN



5.1.2 TELOMERASEAKTIVITÄT IN DEN EINZELNEN STADIEN

Der Anteil der 109 Neuroblastome mit nachweisbarer Telomeraseaktivität verteilte sich wie folgt auf die einzelnen Stadien:

Im Stadium I konnte in einem von 12 (=8%), im Stadium II in sechs von 16 (=37,5%), im Stadium III in fünf von 25 (=20,0%), im Stadium IV in 14 von 45 (=31,0%) und im Stadium IVs in zwei von 11 Tumoren (=18,0%) Telomeraseaktivität nachgewiesen werden.

Es zeigt sich eine leichte Zunahme des Anteils der telomeraseexprimierenden Tumoren vom Stadium I über das III bis hin zum Stadium IV. Das Stadium II weist mit 37,5% den höchsten Anteil an Neuroblastomen mit Telomerasenachweis auf. Das Stadium I weist mit 8% an telomeraseexprimierenden Tumoren den deutlich niedrigsten Anteil auf.

Faßt man die lokalisierten Stadien I und II und die fortgeschrittenen Stadien III und IV zusammen, so erhält man für I/II einen prozentualen Anteil der Tumoren mit positiver Telomeraseaktivität von ca. 25% und für III/IV von ca. 27%, so daß auch hier kein Unterschied auszumachen ist.

Die 13 Patienten, die nicht ganz eindeutig der Gruppe der telomerasepositiven Neuroblastome zugeordnet werden konnten, verteilten sich wie folgt auf die einzelnen Stadien:

Jeweils 4 Patienten gehören dem Stadium IV (~9%) bzw. II (=25%) an, Stadium I (~17%) und IVs (~18%) haben je 2 Patienten und Stadium III einen Patienten (=4%) in dieser Gruppe.

Wir konnten in dieser Studie keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Stadium der Erkrankung und der Aktivität des Enzyms nachweisen, was anhand der Grafik mit den prozentualen Anteilen der telomerasepositiven Neuroblastome an den einzelnen Stadien (Abb. 5) nachvollziehbar verdeutlicht wird.

Abb. 5 zeigt den Anteil der Neuroblastome mit nachweisbarer Telomeraseaktivität in den einzelnen Stadien.

Abb. 6 zeigt die Aufteilung der Tumoren in den einzelnen Stadien auf den eindeutig negativen, eindeutig positiven und auf den Grenzbereich an.

ABB. 5: TELOMERASEAKTIVITÄT IN DEN EINZELNEN STADIEN

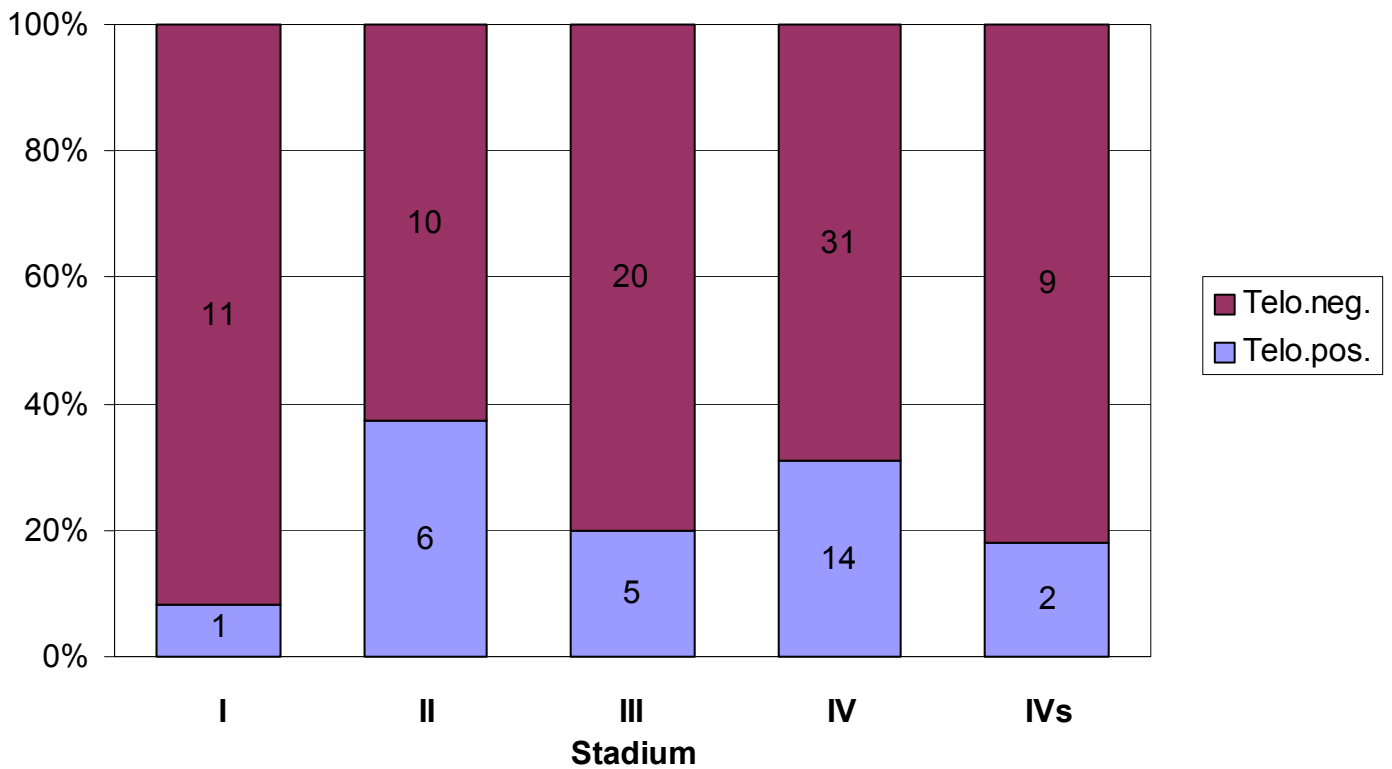
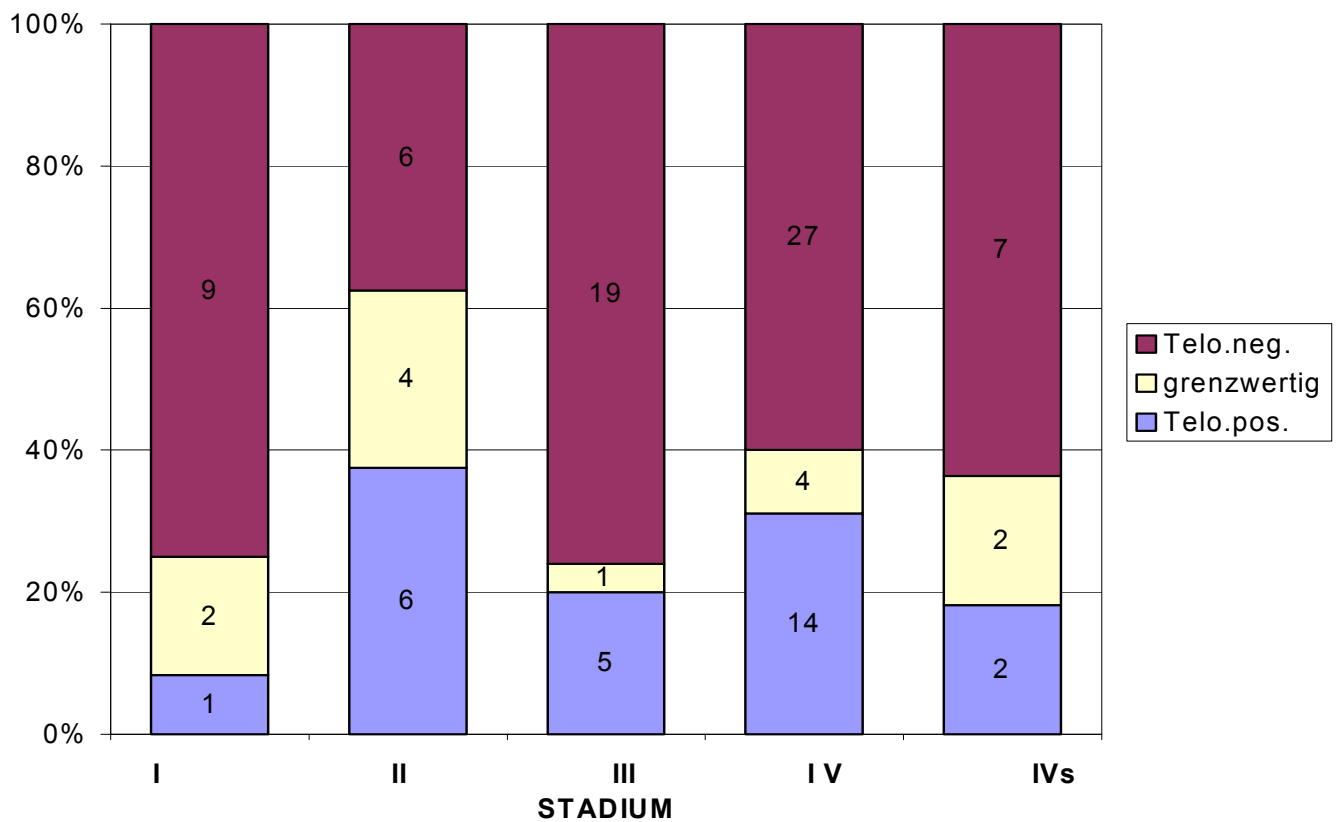


ABB. 6: TELOMERASEAKTIVITÄT IN DEN EINZELNEN STADIEN



5.1.3 TELOMERASEAKTIVITÄT UND ÜBERLEBEN

Die Bedeutung der Telomerase im Hinblick auf die Prognose eines Patienten war eine der wichtigsten Fragen dieser Arbeit.

Von den 28 Patienten mit einem Neuroblastom, welches Telomeraseaktivität aufwies, verstarben 14 und damit 50%. Dem stehen aus dem Kollektiv der Neuroblastome ohne Telomeraseaktivität von 81 Patienten 16 Verstorbene gegenüber, was einem deutlich niedrigerem Anteil von 20% entspricht.

Aus einer anderen Sicht betrachtet bedeutet das: von 30 verstorbenen Patienten wiesen 14 ein Neuroblastom mit Telomeraseaktivität auf (46%), während bei den übrigen 78 Neuroblastompatienten, die überlebten, lediglich in 14 Tumoren (18%) das Enzym Telomerase nachweisbar war.

Von den 30 verstorbenen Patienten wiesen 13 weder eine Telomeraseaktivität noch eine MYCN-Amplifikation auf; sie alle gehörten allerdings dem Stadium IV an. Bei sieben der Verstorbenen war sowohl Telomeraseaktivität als auch eine MYCN-Amplifikation nachweisbar. Sieben hatten keine Amplifikation, aber nachweisbare Telomeraseaktivität. Lediglich drei der Verstorbenen wiesen einen Tumor mit MYCN-Amplifikation auf aber keine nachweisbare Telomeraseaktivität. Bis auf eine Ausnahme, die dem Stadium II entstammt, gehören alle verstorbenen Patienten dem Stadium IV an. Der Tumor des Patienten aus Stadium II weist Telomeraseaktivität, aber keine MYCN-Amplifikation auf.

Die Kaplan-Meyer-Überlebensanalyse zeigt mit einer Signifikanz von $p=0,0039$ (log-rank-Test) eine deutlich schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten aller Stadien mit Telomeraseaktivität (Abb.9). Hierbei besteht Ausgeglichenheit hinsichtlich des Alters und der Stadienverteilung in diesen beiden Gruppen.

Für das Stadium IV alleine zeigt Telomeraseaktivität in den Neuroblastomen nur eine geringe Tendenz für einen schlechteren Verlauf der Erkrankung (Abb. 10).

In den beiden im Säuglingsalter klinisch schwer zu unterscheidenden Stadien IV und IVs zeigt sich allerdings mit einem $p=0,015$ eine signifikant schlechtere Prognose der Patienten mit einem telomeraseexprimierendem Tumor (Abb. 11).

Ähnliches, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß ($p=0,0539$), gilt für die Stadien III und IV, deren Verlauf bei Nachweis von Telomeraseaktivität ungünstiger ist (Abb. 12). Letztlich wird mit einem $p=0,0019$ auch für die Stadien I, II und IVs mit einer an sich günstigen Prognose die Rolle der Telomeraseaktivität als Prognosefaktor deutlich (Abb.13).

Abb. 7 zeigt den Anteil der Verstorbenen an den beiden Tumorguppen mit und ohne Telomeraseaktivität.

Abb. 8 zeigt den Anteil der Patienten mit telomerasepositiven Tumoren an den Verstorbenen und den Überlebenden.

Abb. 9-13 zeigt die Kaplan-Meyer-Überlebenswahrscheinlichkeitsanalyse der beiden Telomeraseaktivitätsgruppen in verschiedenen Stadien.

ABB. 7: ANTEIL DER VERSTORBENEN AN DEN BEIDEN TELOMERASEGRUPPEN

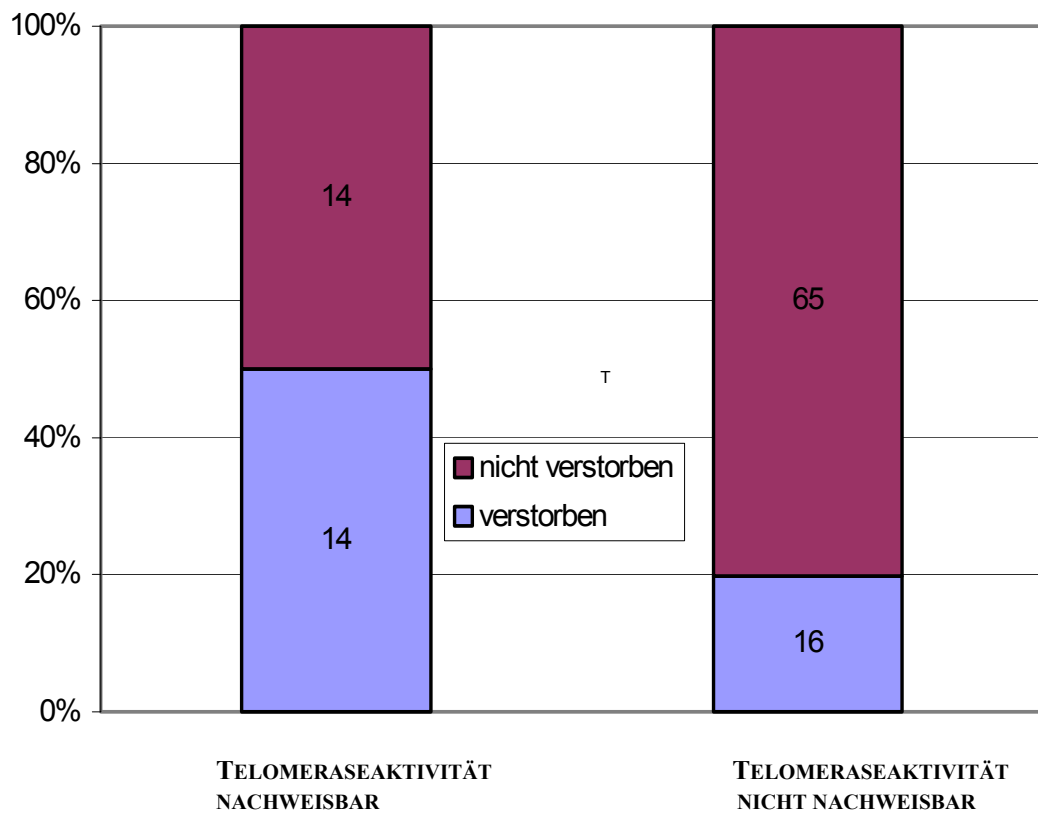


ABB. 8: ANTEIL DER PATIENTEN MIT TELOMERASEPOSITIVEN TUMOREN AN DEN ÜBERLEBENDEN UND DEN VERSTORBENEN

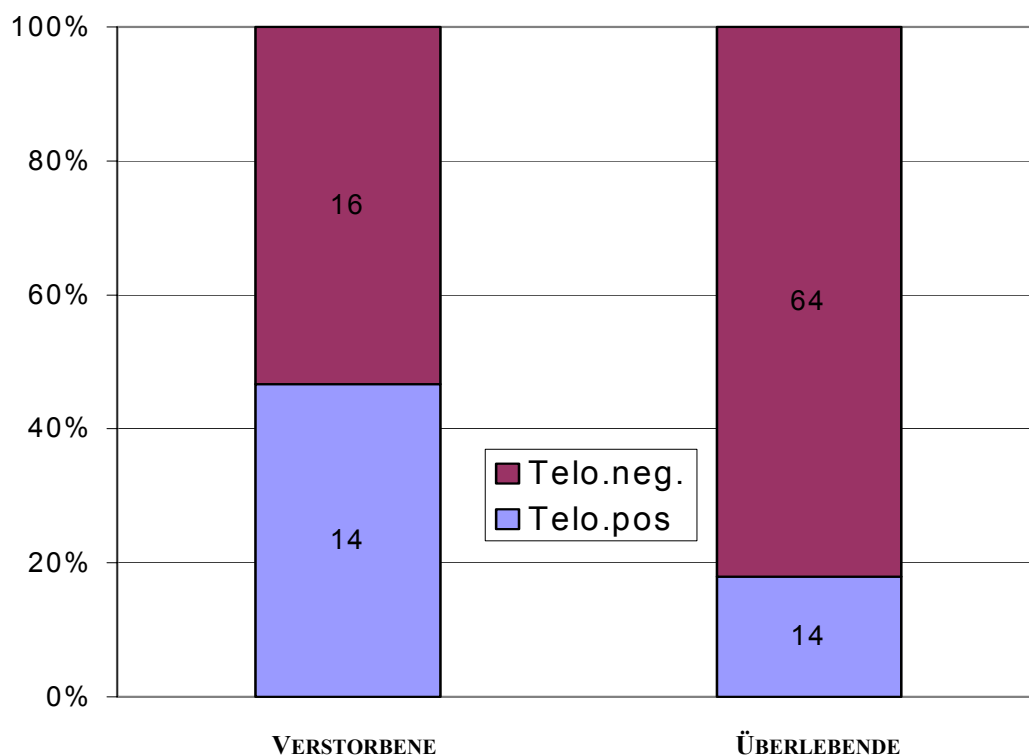


ABB. 9: TELOMERASEAKTIVITÄT UND ÜBERLEBEN IN ALLEN STADIEN

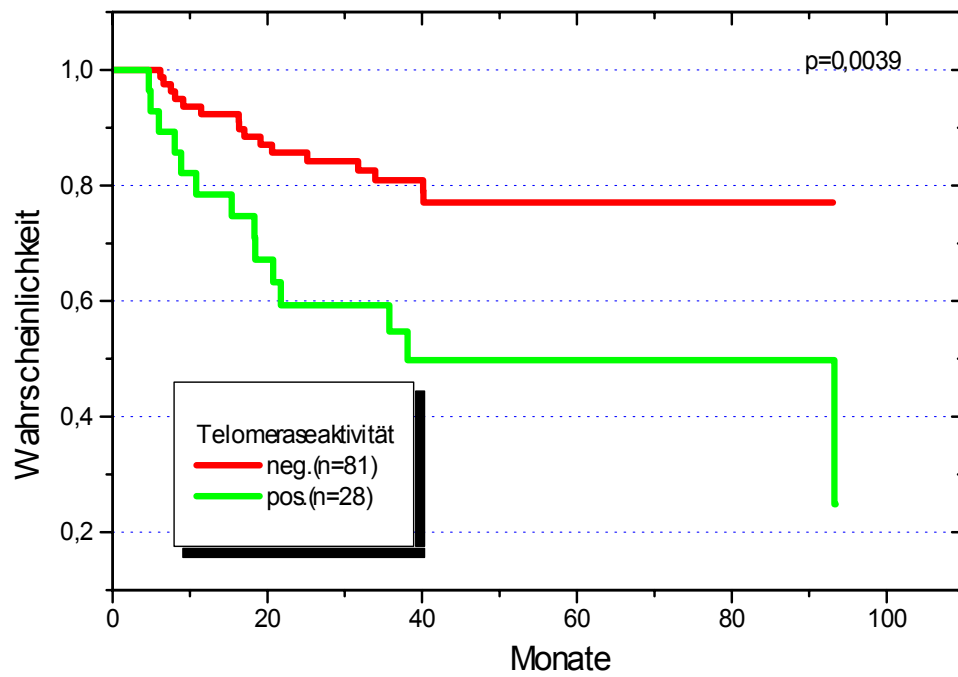


ABB. 10: TELOMERASEAKTIVITÄT UND ÜBERLEBEN IM STADIUM IV

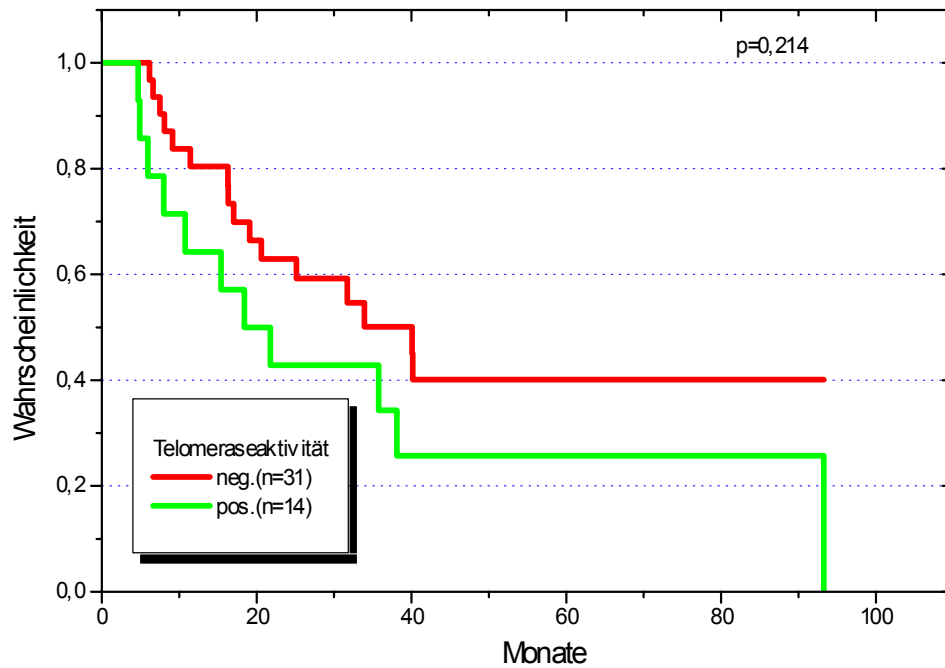


ABB. 11: TELOMERASEAKTIVITÄT UND ÜBERLEBEN IN DEN STADIEN IV UND IVs

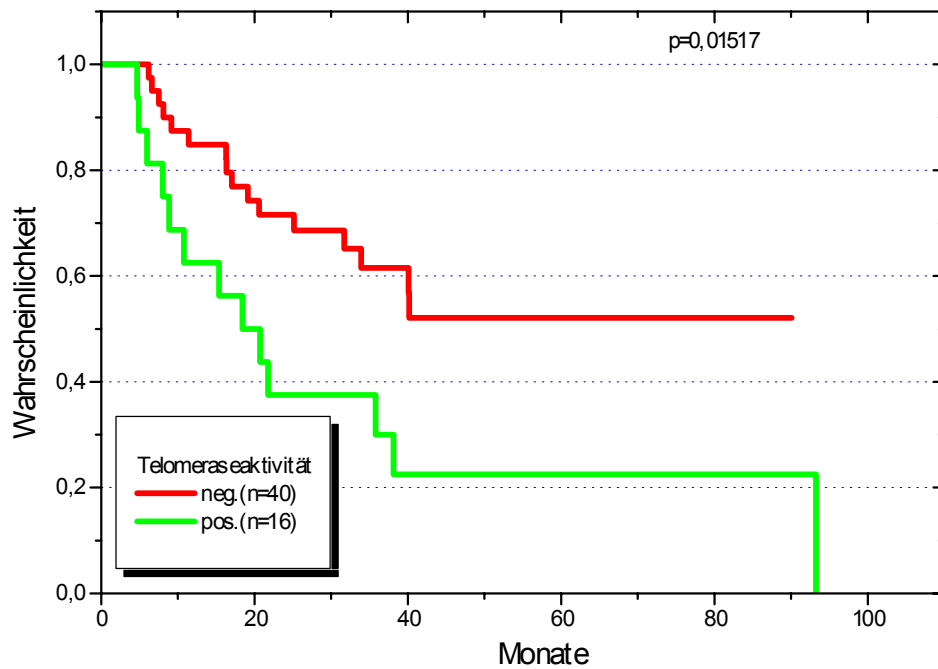


ABB. 12: TELOMERASEAKTIVITÄT UND ÜBERLEBEN IN DEN STADIEN III UND IV

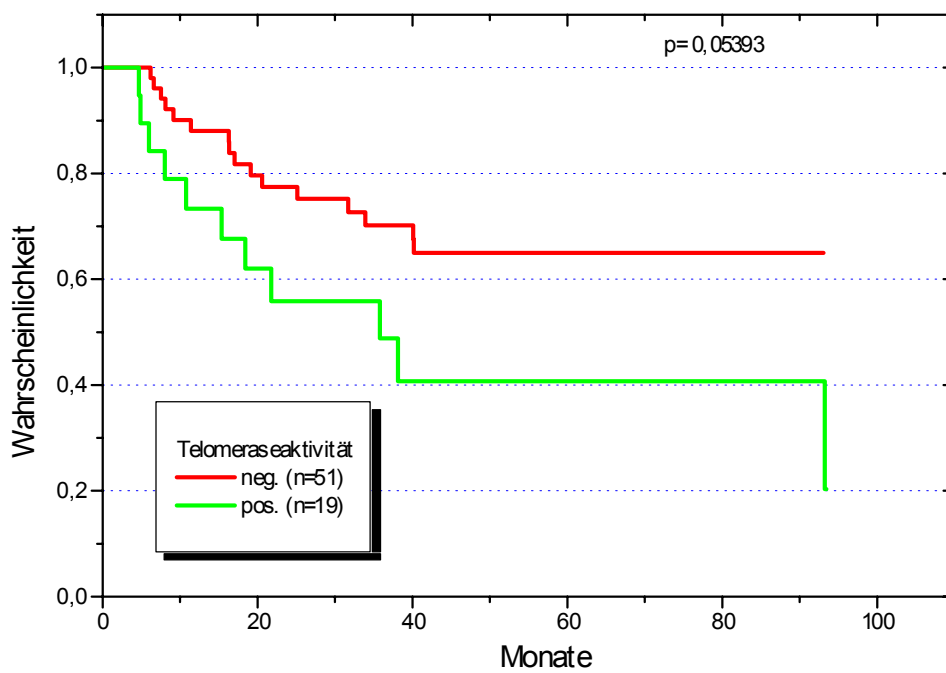
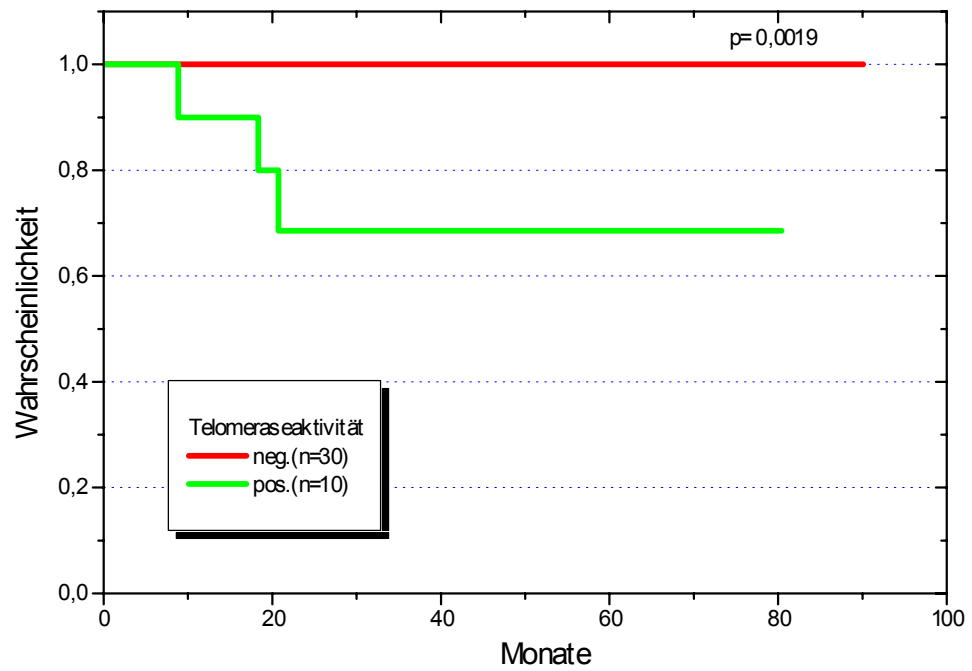


ABB. 13: TELOMERASEAKTIVITÄT UND ÜBERLEBEN IN DEN STADIEN I, II UND IVs



5.1.4 TELOMERASEAKTIVITÄT UND MYCN-AMPLIFIKATION

Aufgrund der entscheidenden Rolle der MYCN-Amplifikation für die Prognose des Neuroblastoms war ein möglicherweise bestehender Zusammenhang der Telomerase mit diesem Parameter von besonderem Interesse.

Von den 109 untersuchten Neuroblastomen hatten 18 eine MYCN-Amplifikation, 91 Neuroblastome waren dementsprechend nicht amplifiziert. Diese Daten wurden mir freundlicherweise von Herrn PD Dr. Christiansen für die Verwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Von den 18 MYCN-amplifizierten Tumoren wiesen 50% Telomeraseaktivität auf, während es bei den 91 nicht-amplifizierten Neuroblastomen nur 21% waren.

Im Vergleich dazu weisen von den 28 Patienten mit telomeraseexprimierenden Tumoren mehr als ein Drittel, nämlich 9 Patienten eine MYCN-Amplifikation auf. In der Gruppe der Neuroblastome ohne meßbare Telomeraseaktivität waren es hingegen nur 11%, neun der 81 Patienten.

Bis auf das Stadium II ist die Verteilung dieser beiden Faktoren in den unterschiedlichen Stadien ähnlich:

Im Stadium I findet sich ein Tumor mit Telomeraseaktivität und keiner mit einer MYCN-Amplifikation, Stadium III hat fünf Neuroblastome mit Telomeraseaktivität und sechs mit einer MYCN-Amplifikation, wobei es hier erstaunlicherweise keine Überschneidungen gibt. Im Stadium IV wiesen 14 Neuroblastome Telomeraseaktivität auf und elf eine MYCN-Amplifikation, Stadium IVs hingegen umfaßt zwei Neuroblastome mit Telomeraseaktivität und eines mit Amplifikation. Nur Stadium II fällt mit sechs telomeraseexprimierenden Neuroblastomen und einer MYCN-Amplifikation auch hier aus der Reihe.

Neun Patienten wiesen sowohl eine MYCN-Amplifikation als auch Telomeraseaktivität auf, sieben dieser Patienten sind verstorben. Von den zehn Patienten mit einem MYCN-amplifizierten Neuroblastom verstarben drei. Die Kaplan-Meyer-Überlebensanalyse für die Gruppe der Patienten mit einem amplifizierten Neuroblastom zeigt für diese Subgruppe einen deutlich schlechteren Verlauf der Erkrankung bei zusätzlichem Nachweis von Telomeraseaktivität.

Von den neun Neuroblastomen mit einer MYCN-Amplifikation von mehr als 20 Kopien waren bis auf eine Ausnahme alle telomerasepositiv. Umgekehrt waren von den neun Neuroblastomen mit einer MYCN-Amplifikation von kleiner gleich 20 Kopien bis auf eine Ausnahme alle telomerasenegativ.

Die Analyse der Korrelation mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests konnte eine signifikante Korrelation von MYCN-Amplifikation und Telomeraseaktivität mit $p = 0,01$ in dieser Arbeit belegen.

Abb. 14 zeigt neben der Gesamtzahl der Tumoren in den einzelnen Stadien die Anzahl der Tumoren 1. mit Telomeraseaktivität, 2. MYCN-Amplifikation und 3. mit Telomeraseaktivität und MYCN-Amplifikation.

Abb. 15 zeigt den Anteil der Tumoren mit Telomeraseaktivität an den beiden Gruppen der nicht-MYCN-amplifizierten und der amplifizierten Neuroblastome.

Abb. 16 und 17 zeigen die Kaplan-Meyer-Analysen der Patienten mit telomeraseexprimierenden Neuroblastomen gruppiert nach vorhandener bzw. fehlender MYCN-Amplifikation.

ABB. 14: TELOMERASEAKTIVITÄT UND MYCN-AMPLIFIKATION IN DEN EINZELNEN STADIEN

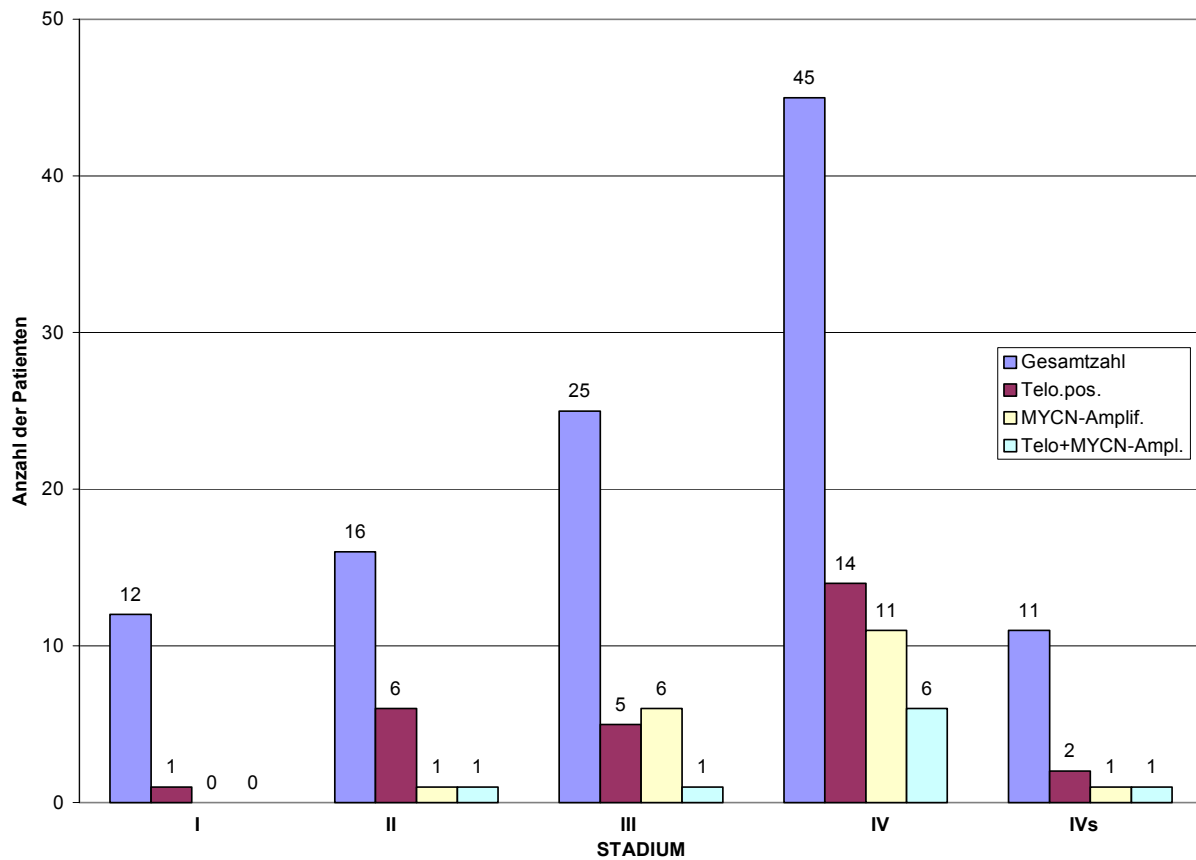


ABB. 15: TELOMERASEAKTIVITÄT DER MYCN-AMPLIFIZIERTEN UND DER NICHT-AMPLIFIZIERTEN

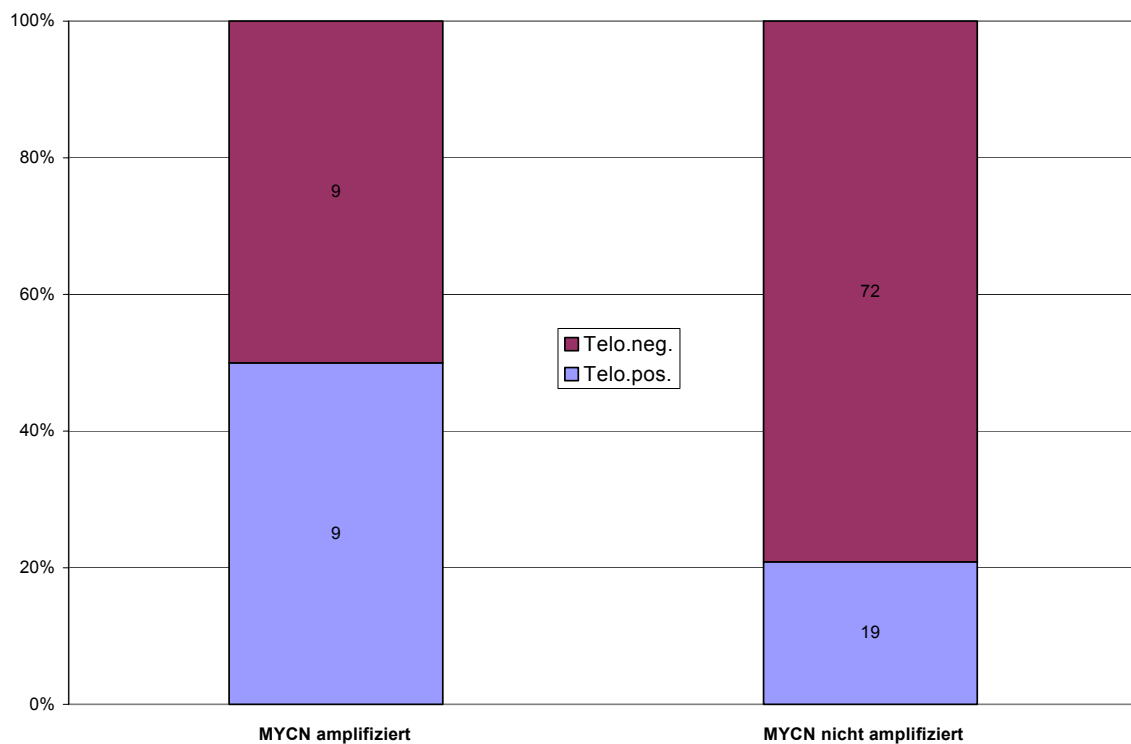
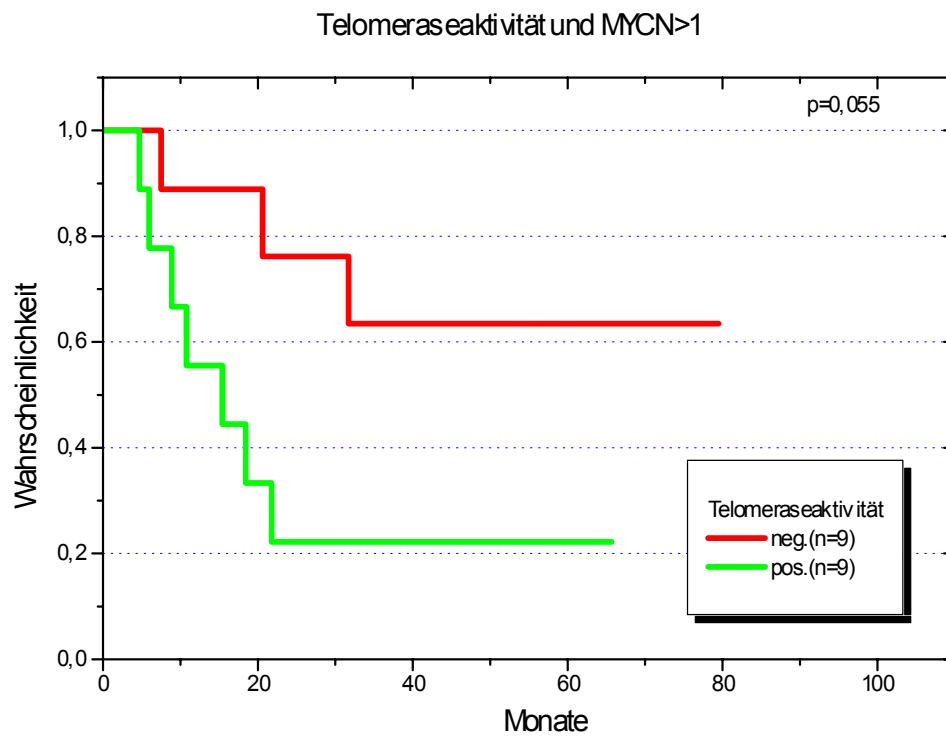
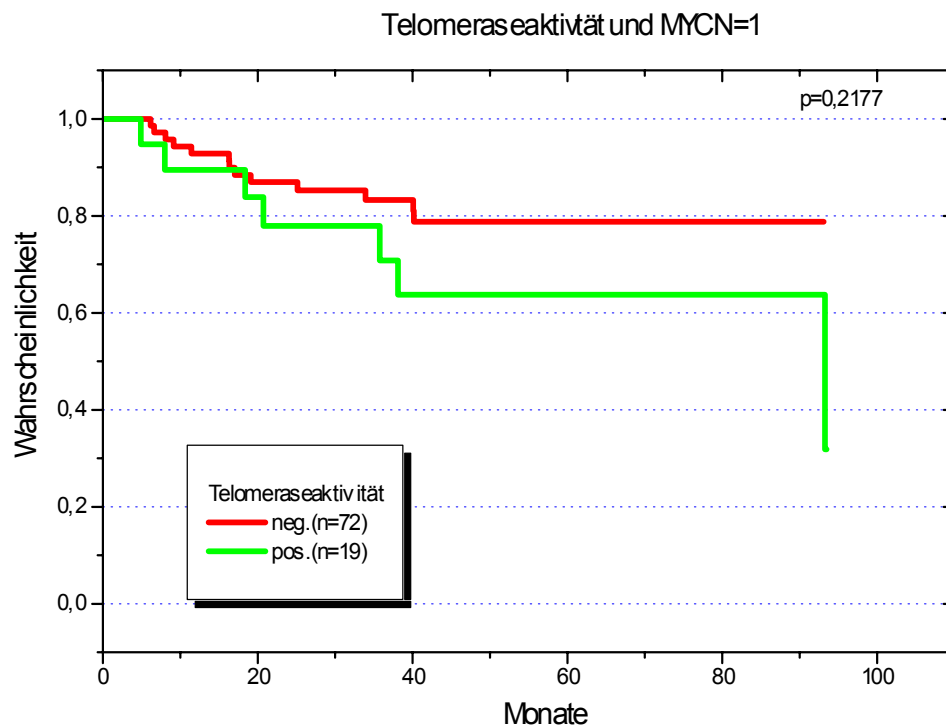


ABB. 16/17: TELOMERASEAKTIVITÄT, MYCN-AMPLIFIKATION UND ÜBERLEBEN



5.1.5 TELOMERASEAKTIVITÄT UND LOH

Für 73 der 109 Neuroblastome lagen Informationen über den Genlokus 1p36 vor, die ebenso wie die Daten über die MYCN-Amplifikation im Neuroblastomlabor gewonnen wurden und mir freundlicherweise von PD Dr Christiansen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

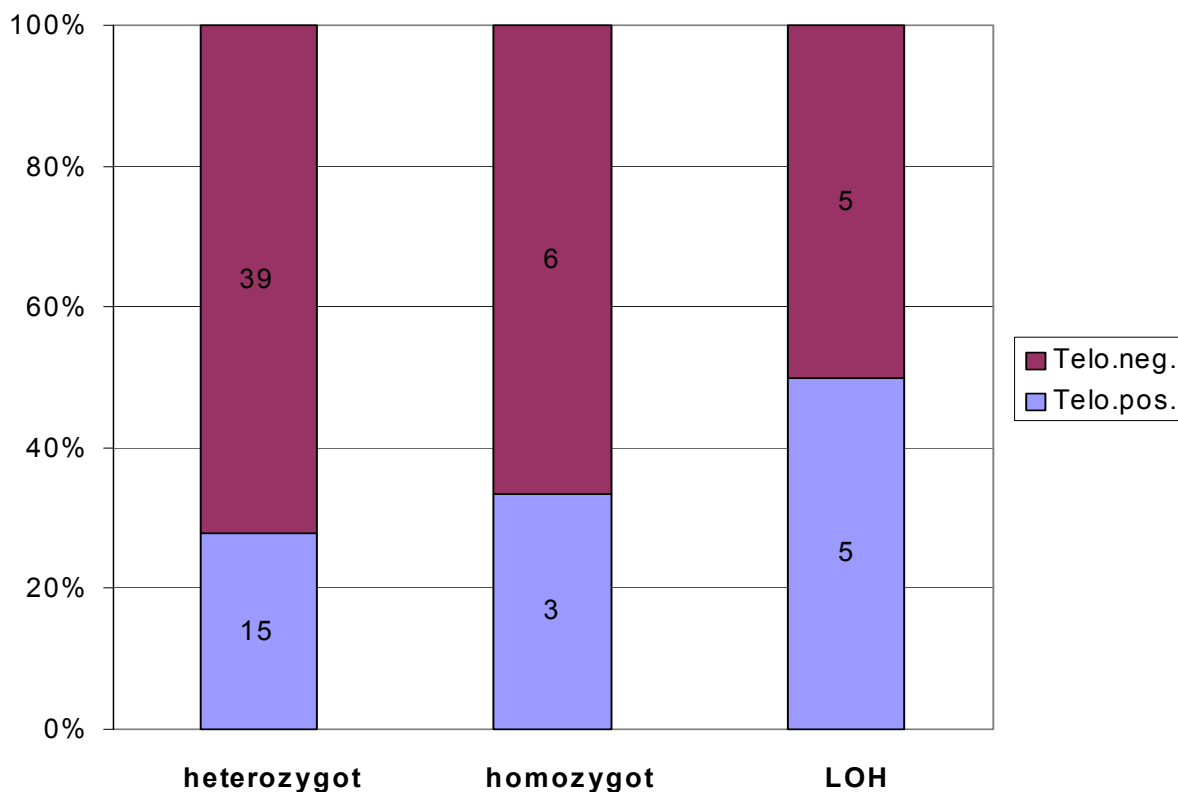
Neun der 73 Tumoren waren homozygot für den Genlokus 1p36, 54 waren heterozygot und bei zehn der Neuroblastome konnte der Verlust des Allels (LOH = loss of heterozygosity) nachgewiesen werden.

Die Verteilung der Tumoren mit einem LOH 1p36 auf die beiden Gruppen der Telomeraseaktivität (positiv und negativ) ergab sich wie folgt: von 23 Neuroblastomen mit Telomeraseaktivität zeigten fünf einen Verlust der Heterozygotie in diesem Bereich. Ebenso viele fanden sich in der Gruppe der 50 Neuroblastompatienten ohne telomerase-exprimierenden Tumor.

In der Gruppe der Tumoren mit einem normalen Status für dieses Allelenpaar, also heterozygoten Tumoren, verstarben neun Patienten, fünf davon waren telomerasepositiv (55,5%). Von den 45 Patienten, die überlebten waren zehn telomerasepositiv (22%).

In der Gruppe der zehn Neuroblastome mit einem Verlust der Heterozygotie verstarben fünf Patienten, bei drei von ihnen konnte Telomeraseaktivität des Tumors nachgewiesen werden.

ABB. 18: TELOMERASEAKTIVITÄT IN DEN GRUPPEN FÜR HOMO- UND HETEROZYGOTIE UND VERLUST DER HETEROZYGOTIE 1P36



5.1.6 TELOMERASEAKTIVITÄT UND ALTER

Das Alter der Patienten bei Diagnosestellung spielt für die Prognose beim Neuroblastom eine große Rolle. So haben Kinder, die in einem Alter unter einem Jahr diagnostiziert werden, eine deutlich bessere Überlebenschance, als Kinder, die älter als ein Jahr sind. Aus diesem Grund wurde die Telomeraseaktivität in diesen beiden Gruppen getrennt voneinander betrachtet.

Von den 109 untersuchten Patienten waren bei Diagnosestellung 32 jünger als ein Jahr. Hier konnte in 10 Tumoren und damit in 31,3% Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, fünf dieser Kinder verstarben (50%), davon zwei im Stadium IVs.

In der Gruppe der Patienten über 12 Monate wurden 17 Tumoren als telomerasepositiv getestet, was einem Anteil von 23% entspricht. Von diesen 17 Patienten verstarben neun (53%), gegenüber 15 Verstorbenen aus der Gruppe der 57 (26%) nicht telomeraseexprimierenden Neuroblastome. Drei Tumoren in der Gruppe der Patienten über einem Jahr wurden hier nicht mit einbezogen, da es sich bei dem vorhandenen Probenmaterial um Tumorgewebe aus einem Rezidiv handelt.

Es zeigt sich ein leicht höherer Anteil der telomeraseexprimierenden Tumoren in der Gruppe der Kinder unter einem Jahr. Desweiteren zeigen die Kaplan-Meyer-Analysen in den beiden Gruppen einen schlechteren Verlauf der Erkrankung bei Nachweis von Telomeraseaktivität. In der Gruppe der Säuglinge (Kinder unter einem Jahr) ist dies mit einem $p=0,00189$ signifikant, während für die Gruppe der älteren Kinder kein signifikanter Unterschied in der Prognose ersichtlich wird; ein Trend hierfür zeichnet sich aber ebenfalls ab.

Abb. 19 zeigt die Telomeraseaktivität in den beiden Altersgruppen unter bzw. über einem Jahr.

Abb. 20 zeigt die Telomeraseaktivität und Alter der Patienten bei Diagnosestellung unter einem Jahr.

Abb. 21 zeigt die Telomeraseaktivität und das Alter der Patienten bei Diagnosestellung über einem Jahr.

ABB. 19: TELOMERASEAKTIVITÄT IN DEN BEIDEN ALTERSGRUPPEN UNTER BZW. ÜBER EINEM JAHR

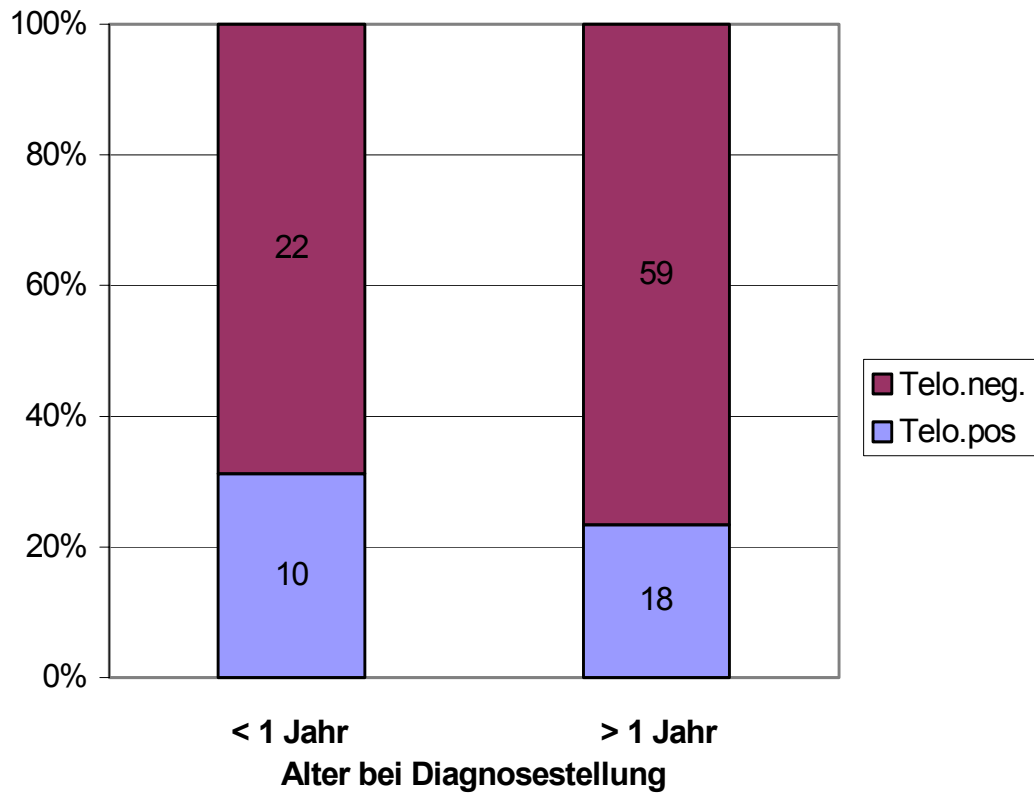
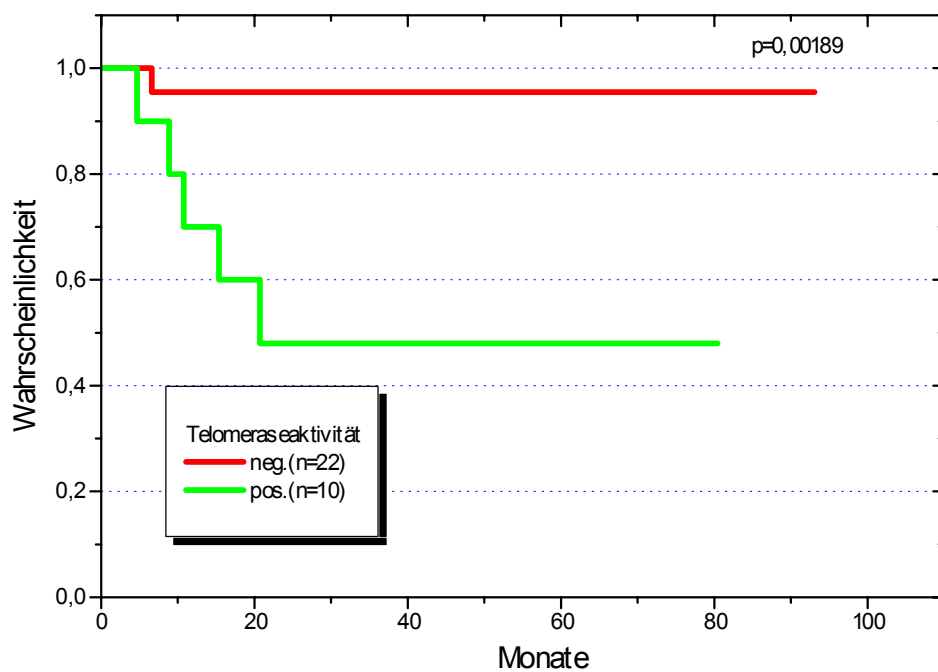
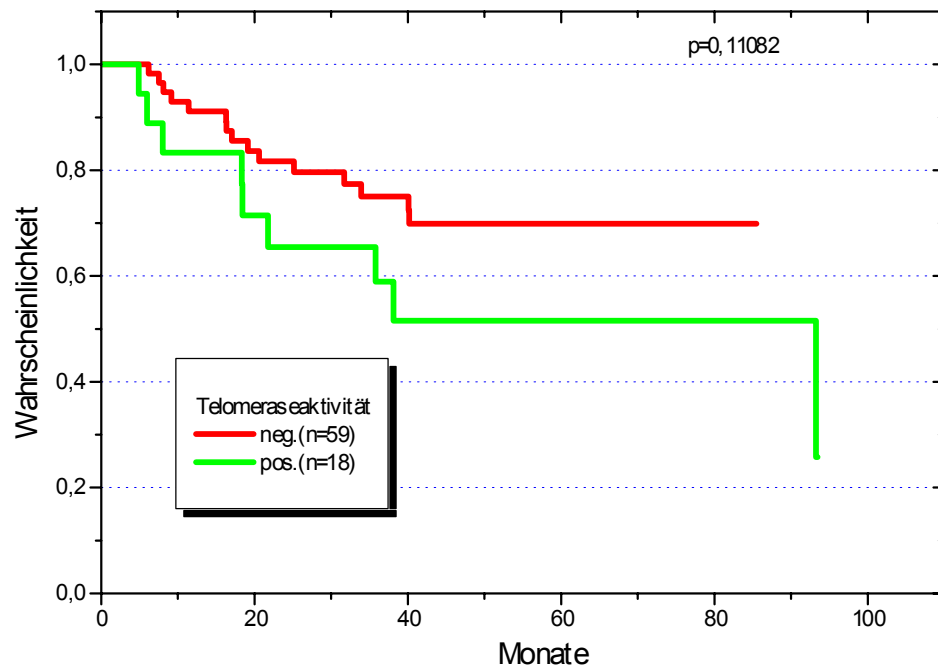


ABB. 20: TELOMERASEAKTIVITÄT UND ALTER DER PATIENTEN BEI DIAGNOSESTELLUNG UNTER EINEM JAHR



**ABB. 21: TELOMERASEAKTIVITÄT UND ALTER DER PATIENTEN BEI DIAGNOSE-
STELLUNG ÜBER EINEM JAHR**



6. DISKUSSION

Gegenstand dieser Arbeit war die Messung der Aktivität des Enzyms Telomerase in 109 Neuroblastomen nach einer modifizierten TRAP-Methode, im Rahmen derer für den Schritt des Aktivitätsnachweises ein ELISA durchgeführt wurde.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der Telomerase in der Tumorforschung ergab sich auch für die Neuroblastomforschungsgruppe die Frage nach der prognostischen Relevanz der Telomeraseaktivität und damit nach der Notwendigkeit, ihren Nachweis in die Routinediagnostik aufzunehmen.

6.1 ARBEITEN MIT DEM TELOMERASE-PCR-ELISA-KIT

Wichtig für eine Methode zur Routinebestimmung eines Parameters ist ein einfaches, schnelles und sicheres Verfahren sowie eine verlässliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Der Telomerase-PCR-ELISA erfüllt diese Bedingungen, da die Ergebnisse bei Bedarf innerhalb eines Tages verfügbar sind und durch die Verwendung eines kommerziellen Kits eine einfache Handhabung garantiert wird.

Weitere Vorteile für die Verwendung eines ELISA sind zum einen die große Anzahl der Patienten, die in einem Versuchsansatz gemessen werden können und somit den Arbeitsaufwand erheblich einschränken, und zum anderen der Wegfall von Radioaktivität, die in alternativen Nachweismethoden teilweise benötigt wird, und eine Gefahrenquelle für die Mitarbeiter eines Labors darstellt.

In der Literatur finden sich sieben Studien über Telomeraseaktivität in Neuroblastomen von insgesamt vier weiteren Arbeitsgruppen. In zwei dieser Studien wurde auf die Aktivität der Telomerase anhand ihrer RNA Komponente (hTR) geschlossen, und in einer weiteren Studie wurde die mRNA Expression für die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTERT) gemessen. In den restlichen vier Studien wurde ebenfalls eine modifizierte TRAP-Methode verwendet, das PCR Produkt allerdings mittels der Gelelektrophorese detektiert.

Autoren	Methode	Anzahl der Neuroblastome	Positiver Nachweis	Besonderheit
Hiyama et al., 1995b	TRAP+ Gelelektrophorese	79	76 (=96%)	
Hiyama et al., 1997	TRAP+ Gelelektrophorese	105	101 (96%)	
Reynolds et al., 1997	Messung der mRNA von hTR	150	61 (41%)	
Brinkschmidt et al., 1998	TRAP+ Gelelektrophorese	13	4 (=31%)	Nur NBL St.IVs
Hiyama et al., 1999	TRAP+ Gelelektrophorese;	35	33 (=94%)	
	Messung der mRNA von hTERT	40	21 (=52%)	
Maitra et al., 1999	Messung der mRNA von hTR	24	22 (=92%)	
Poremba et al., 1999	TRAP+ Laser-Fluoreszenz-Sequencer	67	14 (=20%)	22 NBL St. IVs

Die Verwendung der Methode des Telomerase-PCR-ELISA findet sich in der Literatur zu Beginn unserer Versuchsreihe auch nicht in Studien über andere Tumoren. Erst im Laufe des Jahres 1998 erscheinen fünf Artikel über die Messung von Telomeraseaktivität mit Hilfe des ELISA, die sich allerdings mit Neoplasien im Bereich der Harnblase, der Brust und dem hämatopoetischen System befaßten (Pai, 1998; Hoos, 1998; Mayfield et al., 1998; Xu, 1998). Auch sie begründeten die Wahl der Methode auf der Tatsache, daß Sensitivität und Spezifität vergleichbar mit der klassischen TRAP-Methode sind, der ELISA aber den Vorteil einer schnellen, reproduzierbaren Analyse einer großen Anzahl von Proben bietet.

6.2 TELOMERASEAKTIVITÄT IN NEUROBLASTOMEN

Der Anteil der Neuroblastome mit eindeutig nachweisbarer Telomeraseaktivität in dieser Arbeit ist mit knapp 26% wesentlich geringer als die meisten Untersuchungen der anderen Arbeitsgruppen ergaben.

Die ersten Daten über Telomeraseaktivität in Neuroblastomen stammen von Hiyama et al., 1995, die mittels der TRAP-Methode 79 unbehandelte Neuroblastome untersuchten, wobei sie in 76 Telomeraseaktivität nachweisen konnten, was einer Häufigkeit von 96% entspricht und damit unsere Ergebnisse um ein Vielfaches übertrifft (Hiyama et al., 1995b).

1997 erhöhten sie in einer zweiten Untersuchung die Gesamtzahl der getesteten Tumoren auf 105 und konnten auch hier Telomeraseaktivität in 96% der Tumoren nachweisen und damit ihre Ergebnisse bestätigen. Lediglich in fünf Neuroblastomen konnte keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (Hiyama et al., 1997).

Betrachtet man ihre Einteilung der positiven Telomeraseaktivität in eine hohe und eine niedrige Aktivität, so ergibt sich ein großer Anteil an Tumoren mit niedriger (78/105) gegenüber einem weitaus kleineren (23/105) Anteil mit hochpositiver Telomeraseaktivität.

Beide Studien beschreiben einen Anteil von hochpositiven telomeraseexprimierenden Zellen von 20% bzw. 22% und befinden sich hiermit in einem Bereich, in dem auch unsere Ergebnisse anzusiedeln sind. Dieser Vergleich erscheint angesichts der Tatsache vertretbar, daß ein deutlicher Prognoseunterschied für die Patienten nur in der Gruppe derer mit einem hochtelomeraseexprimierenden Neuroblastom festzustellen ist (hier versterben 57% gegenüber 2% aus der Gruppe derer mit einem niedrigtelomeraseexprimierenden Tumor).

Eine dritte Studie von Hiyama et al. von 1999 befaßt sich mit der Messung der mRNA Expression von hTERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase. Untersucht wurden 35 Neuroblastome: 13 mit hoher Telomeraseaktivität wiesen gleichzeitig hTERT-Expression auf, von 22 Tumoren mit niedriger (n=20) oder fehlender (n=2) Telomeraseaktivität konnten nur in 5 Fällen hTERT-Expression festgestellt werden. Es zeigt sich in dieser Studie zwar eine sehr strenge Korrelation zwischen den Tumoren mit Expression von hTERT und den hochpositiven telomeraseexprimierenden Neuroblastomen, in der Gruppe der niedrigpositiven Tumoren konnte jedoch keine Korrelation nachgewiesen werden (Hiyama et al., 1999).

In einer Reihe von Studien wurde festgestellt, daß die Anwesenheit der mRNA von hTERT streng mit der Telomeraseaktivität korreliert; beide sind in immortalen Zelllinien und in Zelllinien, die von Tumoren stammen, nachweisbar, nicht jedoch in normalen Geweben und Zelllinien. Beide werden supprimiert, wenn in der Zelle die Differenzierung induziert wird (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al. 1997).

Da die katalytische Untereinheit des Enzyms limitierend für seine Aktivität ist und damit seiner Regulation dient (Counter et al., 1998; Wang et al., 1998), läßt der fehlende Nachweis von hTERT in einem Teil der niedrigtelomerasepositiven Tumoren an der Gruppe der

Neuroblastome mit geringer Telomeraseaktivität Zweifel aufkommen. Eine Erklärung für die Messung einer zu hohen Anzahl an telomeraseexprimierenden Tumoren könnte die Verwendung der konventionellen TRAP-Methode sein. Für sie ist mittlerweile beschrieben worden, daß sie aufgrund einer Schwankung während der Hybridisierung der reversen Primer falsch-positive Ergebnisse hervorbringen kann (Poremba et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Telomerase erst bei einer bestimmten Menge an hTERT aktiviert wird und so eine Lücke zwischen dem Nachweis von Telomeraseaktivität und hTERT besteht.

Maitra et al. untersuchten 24 Neuroblastome verschiedener Stadien mittels Messung der Expression der mRNA von hTR, der humanen RNA-Komponente der Telomerase und stellten ein deutliches Überwiegen der Expression in den Neuroblastomen der fortgeschrittenen Stadien fest. Sie teilten den Level der Expression in einen Bereich von sehr schwach (1+) bis sehr stark (4+) ein und erhielten in zehn Fällen eine starke Ausprägung von +3 bis +4 (42%) und in zwölf Fällen eine schwache Ausprägung von +1 bis +2. Nur zwei Tumoren zeigten keine Expression von hTR, beide gehören einem frühen Stadium (I/II) an.

Eine eigentliche Telomeraseaktivität mittels TRAP wurde nur in fünf der 24 Neuroblastome gemessen. Sie ergab für zwei Tumoren des Stadium IVs und einen, aus einem niedrigen Stadium, eine geringe Telomeraseaktivität. Ein Neuroblastom aus dem Stadium IV und eines aus einem niedrigen Stadium, welches eine Amplifikation von MYCN aufwies, zeigten eine sehr hohe Telomeraseaktivität (Maitra et al., 1999).

Auch Reynolds et al. ermittelten die Expression der RNA-Komponente der menschlichen Telomerase, um einen Einfluß auf die Prognose zu ermitteln. Sie teilten die Expression in einen signifikanten (hTR >33, orientiert an einer Zelllinienkontrolle) und einen nicht-signifikanten (hTR <33) Anteil und erhielten so bei 41% der 150 primär unbehandelten Neuroblastome eine signifikante mRNA-Expression von hTR. In einigen dieser Tumoren (eine genaue Zahl wird leider nicht genannt) konnte trotz der Expression der RNA-Komponente keine oder nur sehr geringe Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Auch dies schmälert den Anteil der telomerasepositiven Neuroblastomen wieder, so daß hier ebenfalls deutlich niedrigere Anteile, wie in unserer Untersuchung auch, zu verzeichnen sind. Im Gegensatz hierzu konnte nur in einem der Tumoren eindeutig Telomeraseaktivität bei ganz geringer hTR-Expression nachgewiesen werden (Reynolds et al., 1997).

Mittlerweile ist belegt worden, daß keine enge Korrelation zwischen Telomeraseaktivität und hTR-Expression vorliegt. Der genaue Grund hierfür ist unklar (Hiyama et al., 1999). Avilion et al. stellten fest, daß viele Zelllinien und Tumoren zwar sowohl eine erhöhte Menge an Telomeraseaktivität als auch an hTR aufwiesen, umgekehrt aber hTR auch in Zelllinien und Geweben gefunden wurde, in denen keine Aktivität der Telomerase nachweisbar war. Dies spricht deutlich dafür, daß die RNA-Komponente der Telomerase nicht limitierend und so auch kein guter Indikator für die Enzymaktivität ist (Avilion et al., 1996).

Es gibt zahlreiche Hinweise, daß die Regulation der Telomeraseaktivität ein multifaktorielles Geschehen ist, welches durch Faktoren wie Genexpression, sowohl von hTR als auch hTERT, Protein-Protein-Interaktion posttranslational und auch durch Proteinphosphorylierung beeinflusst wird (Liu, 1999). Angesichts dieser Tatsache scheint es von enormen Vorteil die Aktivität des Enzyms direkt, und nicht nur eine Komponente zu bestimmen, die zahlreichen regulativen Einflüssen ausgesetzt ist. Nur so kann eindeutig nachgewiesen werden, ob Telomerase aktiv ist und dadurch die Möglichkeit zur Telomererhaltung und ungehinderter Proliferation gegeben ist.

Die jüngste Untersuchung der Telomeraseaktivität in Neuroblastomen von Poremba et al. untermauert mit 14 telomeraseexprimierenden Tumoren aus einer Gesamtzahl von 67 Neuroblastomen und damit einem Anteil von 20% unsere Ergebnisse. Es handelt sich bei ihnen zwar um eine sehr große Anzahl an IVs Neuroblastomen (22/67), doch auch ohne diese ergibt sich ein Anteil an telomerasepositiven Tumoren von lediglich 24% (Poremba et al., 1999).

Es ist zu vermuten, daß die ELISA-Methode gegenüber der Detektion mit der Gelelektrophorese in den unteren Bereichen unsicherer ist. Es stellt sich allerdings die Frage ob es sinnvoll ist, eine positive Telomeraseaktivität in eine niedrige und eine hohe Telomeraseaktivität zu unterteilen, wenn nur eine hohe Telomeraseaktivität deutlich mit einer schlechten Prognose einhergeht, nicht aber dagegen niedrige Telomeraseaktivität. Unsere Ergebnisse, die nur von einer hohen Telomeraseaktivität (unter Ausschluß eventueller gering positiver Tumoren, die wir als grenzwertig bezeichnet haben) ausgehen, sind auch ohne diese Unterscheidung signifikant und haben prognostische Aussagekraft.

Auch viele Daten über Telomeraseaktivität in anderen Neoplasien zeigen eine höhere Inzidenz an telomeraseexprimierenden Tumoren als wir in unserer Studie nachweisen konnten. In Arbeiten über Magenkarzinome (Hiyama et al., 1995a), kolorektale Karzinome (Chadeneau et al., 1995), Pankreaskarzinome (Iwao et al., 1997), Brust- (Hiyama et al., 1996) und Lungenkarzinomen (Hiyama et al., 1995c) ergaben sich Anteile der telomeraseexprimierenden Tumoren von 80% bis 95%.

Ähnlich wie beim Neuroblastom konnte jedoch in Studien mit einem weiteren Tumor des Kindesalters, dem Retinoblastom, nur ein geringerer Anteil an telomerasepositiven Tumoren von ca. 50% nachgewiesen werden. Von diesem Tumor ist bekannt, daß nur einige wenige Mutationen (vielleicht nur zwei) für seine Entstehung erforderlich sind (Finkel, 1996). Die Telomere in diesen Tumoren ohne Telomeraseaktivität konnten weiterhin als lang und noch nicht deutlich reduziert beschrieben werden. Es ergibt sich hieraus die Vermutung, daß die normale Teilungskapazität der Retinoblasten ausreicht, um die für eine maligne Transformation notwendigen Mutationen zu erwerben. Es scheint sich für diese Tumorzellen also nicht immer die Notwendigkeit einer Telomeraseaktivierung zu ergeben (Finkel, 1996; Gupta et al., 1996).

Kolonkarzinome hingegen brauchen eine Vielzahl an Mutationen und daher viele Teilungen zu einer Akkumulation der genetischen Veränderungen. Dies könnte erklären, warum 90% der Kolontumoren in ihren Zellen Telomeraseaktivität aufweisen (Finkel, 1996).

Die Aktivierung der Telomerase kann zu jedem Zeitpunkt in der Tumorentwicklung auftreten. Tritt sie früh auf, verfügt der größte Teil der Tumorzellen über Telomeraseaktivität. Tritt sie spät auf, so findet sich nur ein sehr kleiner Anteil an Zellen, die Telomerase aktiviert haben.

Dies könnte erklären, warum man, trotz aller Versuche Biopsien zu erhalten, die repräsentativ für die entsprechende Geschwulst sind und dadurch eine generelle Aussage über die Biologie dieses Tumors ermöglichen, immer wieder feststellen muß, daß dies nicht gelingt. Selbst bei zehn Proben aus dem gleichen Neuroblastom kann man angesichts seiner inhomogenen Struktur (Brodeur et al., 1997c) nicht sicher gehen, daß man den Bereich der Zellen, die eine Amplifikation von MYCN und/oder Telomeraseaktivität aufweisen, getroffen hat.

Eine Biopsie an der falschen Stelle würde so ein negatives Ergebnis erbringen, obwohl Telomeraseaktivität in einem Teil des Tumors vorliegt.

Weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang genetischer Alterationen des Neuroblastoms und den notwendigen Zeitpunkt der Telomeraseaktivierung und damit der Tumormenge die telomerasepositiv ist, sind in naher Zukunft zu erwarten.

6.3 TELOMERASEAKTIVITÄT ALS PROGNOSEFAKTOR

In allen Studien über Telomeraseaktivität in Neuroblastomen konnte nachgewiesen werden, daß die Telomerase als negativer Prognosefaktor zu bewerten ist. Dies ist auch anhand unserer Daten nachzuvollziehen. Zum einen zeigt die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meyer bei ausgeglichener Alters- und Stadienverteilung einen signifikant ($p=0,0039$) schlechteren Verlauf der Erkrankung für Patienten aller Stadien mit einem telomeraseexprimierenden Tumor. Zum anderen bekräftigt der mehr als doppelt so hohe Anteil der Verstorbenen in der Gruppe der Patienten mit nachgewiesener Telomeraseaktivität des Tumors diese Feststellung.

Auch das Alter der Patienten per se bei Diagnosestellung spielt für die Prognose bei Neuroblastomen eine bedeutende Rolle. Abgesehen davon, daß das prognostisch außergewöhnliche Stadium IVs nur im Säuglingsalter vorkommt, sind auch die Überlebenschancen in den anderen Stadien für die Patienten unter einem Jahr bedeutend besser. So liegen im Stadium III und IV die Überlebenschancen für Kinder unter einem Jahr bei 80-90% bzw. 60-75%. Verglichen dazu, betragen sie bei den Älteren (>1 Jahr) nur 50% bzw. 15% und sind somit deutlich schlechter (Castleberry et al., 1997).

Aus diesem Grunde wurde der Nachweis von Telomeraseaktivität in diese beiden Gruppen getrennt voneinander betrachtet, was zur Feststellung eines deutlichen Unterschiedes in der Bedeutung der Telomerase führte.

In unserer Untersuchung zeigt sich in der Kaplan-Meyer-Überlebensanalyse für die Gruppe der Patienten unter einem Jahr und einem Tumor mit Nachweis von Telomeraseaktivität ein signifikant schlechterer Verlauf der Erkrankung ($p=0,00189$). Eine solche Signifikanz konnte, trotz dem zu erkennenden Trend eines schlechteren Verlaufs, in der Gruppe der Kinder über 12 Monate nicht festgestellt werden.

Man kann daher im Säuglingsalter in der Telomerase einen, im Vergleich zum fortgeschrittenen Alter, besseren Prognosefaktor sehen. Säuglinge, die aufgrund ihres Alters eine gute Prognose hätten, können in zwei Untergruppen aufgeteilt werden (positive und negative Telomeraseaktivität), um die Therapie zu optimieren. Hierbei ist vor allem auf die beiden verstorbenen Patienten aus dem Stadium IVs zu verweisen, die als einzige in diesem Stadium einen Tumor mit nachweisbarer Telomeraseaktivität aufwiesen (nur einer davon mit MYCN-Amplifikation).

Die Tatsache, daß Nebennieren von Feten der 16ten und 18ten Gestationswoche Telomeraseaktivität aufweisen, solche von einem Neugeborenen, einem zweimonatealten oder einem einjährigen Kind aber nicht, läßt vermuten, daß Telomeraseaktivität normalerweise kurz vor der Geburt inaktiviert wird (Hiyama et al., 1995b). Bleibt sie länger aktiv, kann es zur Entwicklung eines Neuroblastoms kommen, welches sich später spontan zurückbildet, aufgrund einer verspäteten Inaktivierung der Telomerase. Weiterhin findet sich in Gegenden, in denen Screeninguntersuchungen für das Neuroblastom durchgeführt werden, eine höhere Inzidenz des Tumors als in Gegenden ohne ein solches Screening. Vermutlich führt spontane Regression dazu, daß ein Teil der entstehenden Neuroblastome nicht klinisch manifest wird und so unentdeckt bleibt (Berthold, 1997).

Diese Tatsache und die Tatsache, daß in der Gruppe der jüngeren Patienten viel häufiger spontane Regression vorkommt, haben zu folgender Hypothese geführt: Es gibt zwei verschiedene Typen von Neuroblastomen. Zum einen Neuroblastome, die als embryonale Überbleibsel aus der Entwicklung hervorgehen, somit früh im Leben auftreten und zu spontaner Regression neigen wie das Zuckerkandlesche Organ und andere Paraganglien. Zum anderen Neuroblastome, die später in Erscheinung treten und die charakteristische Progression eines malignen Tumors zeigen (Berthold, 1997).

Ergänzend zu dieser Hypothese stellten Hiyama und seine Mitarbeiter fest, daß das Aktivitätslevel der Telomerase mit dem Alter der Patienten korreliert. So waren 87% der Neuroblastome mit geringer Telomeraseaktivität von Patienten unter einem Jahr, während 89% der Neuroblastome mit hoher Aktivität von Patienten stammten, die älter als ein Jahr bei Diagnosestellung waren (Hiyama et al., 1995b).

Sie interpretierten die Daten so, daß in vielen Neuroblastomen der Stadien I, II und IVs Telomeraseaktivität nachweisbar, jedoch nicht in der Lage ist, die Telomerlänge zu erhalten und die Tumoren so irgendwann einem Wachstumsstop unterliegen.

Diese Untersuchung gab Anlaß zu der Vermutung, daß es sich bei telomeraseexprimierenden Neuroblastomen des Säuglingsalters um eine fehlerhafte Repression der Telomerase handeln könnte, die die Entstehung einer Neoplasie begünstigt. Im Gegensatz hierzu wäre für die Enzymaktivität in der Gruppe der älteren Patienten, wie bei Erwachsenen auch, eine Reaktivierung der Telomerase verantwortlich. So könnte niedrige Telomeraseaktivität bei jüngeren Kindern mit einem Neuroblastom im Stadium IVs reprimiert werden und so für Tumorregression verantwortlich sein (Hiyama et al., 1995b).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen mit der Hypothese von Hiyama et al. nicht im Einklang. Geht man davon aus, daß es sich bei dem Nachweis von Telomerase in der Gruppe der Säuglinge um eine verspätete Repression oder eine für die Erhaltung der Telomerlänge nicht ausreichende Enzymaktivität handelt, so wäre Telomeraseaktivität nicht für die Progression dieser Neuroblastome verantwortlich. Es ließe sich dann eine schlechtere prognostische Aussagekraft der Telomeraseaktivität in der Gruppe der Säuglinge erwarten.

Es könnte sich bei den älteren Kindern mit einem telomerasepositiven Neuroblastom zwar tatsächlich um eine Reaktivierung der Telomerase handeln, die im Rahmen der zahlreichen genetischen Veränderungen, wie MYCN-Amplifikation und LOH 1p36 auftreten könnte, doch ist die Telomeraseaktivität hier nur einer der Faktoren, der die Prognose negativ beeinflußt und kann daher nicht so deutlich zur Unterteilung in zwei Untergruppen herangezogen werden. Ihre Aussagekraft ist daher abgeschwächt.

Der anteilmäßig höhere Anteil der telomerasepositiven Tumoren in der Gruppe der Säuglinge könnte dann mit einer fehlenden Repression des Enzyms erklärt werden. Allerdings kann man nicht davon ausgehen, daß die fehlende Repression das Enzym weniger leistungsfähig macht. Viel eher ist davon auszugehen, daß die Tumorzellen viel früher eine größere Wachstumspotenz besitzen, die zu vermehrter Progression befähigt und daher einen größeren Einfluß auf den Krankheitsverlauf der einzelnen Patienten hat.

So ist also vor allem bei den Säuglingen bei Nachweis von Telomeraseaktivität ein aggressiveres Therapieschema anzustreben, während bei den älteren Kindern die Telomerase nur eine zusätzlich Information liefern kann, alleine jedoch nicht ausreichend ist.

6.4 TELOMERASEAKTIVITÄT UND STADIENEINTEILUNG

Aufgrund der vielfach beobachteten schlechteren Prognose von Patienten mit einem telomeraseexprimierenden Neuroblastom, hätte man einen zunehmenden Anteil der Tumoren mit Telomeraseaktivität in den höheren Stadien erwarten können.

Lediglich ein Patient aus dem Stadium I konnte als telomerasepositiv beschrieben werden. Er überlebte den Beobachtungszeitraum. Da das Stadium I durch eine Operation in den meisten Fällen durch komplette Entfernung geheilt werden kann, liegt die Vermutung nahe, daß eine große Wachstumspotenz durch Telomeraseaktivität hier keinen bedeutenden Unterschied in der Prognose hervorruft. Die kleine Fallzahl läßt allerdings keine eindeutigen Aussagen zu.

Im Stadium II fanden wir sechs telomerasepositive Tumoren und damit den höchsten Prozentsatz aller Stadien, einer der Patienten verstarb. Auch in diesem Stadium kann man von einer weitgehend lokalen Begrenzung des Tumors ausgehen. Zudem erfolgt im Vergleich zum Stadium I eine radikalere Therapie (Operation + Chemotherapie), so daß sich erklären könnte, warum auch hier wieder der Einfluß der Telomeraseaktivität relativ gering ist.

Von den Neuroblastomen der Patienten im Stadium III wiesen fünf Telomeraseaktivität auf. Erstaunlicherweise wurde im Laufe des Beobachtungszeitraumes in keinem Fall das Versterben eines dieser Patienten beobachtet. Weiterhin fanden sich in diesem Stadium fünf Patienten mit einem MYCN-amplifizierten Tumor, die alle den Beobachtungszeitraum überlebt haben. Für dieses Stadium isoliert betrachtet, ergibt sich also in unserer Arbeit weder mit MYCN-Amplifikation noch mit Telomeraseaktivität ein verlässlicher prognostischer Marker.

Im Stadium IVs finden wir von elf Patienten zwei mit nachweisbarer Telomeraseaktivität ihres Tumors, lediglich einer von ihnen zeigte zusätzlich eine MYCN-Amplifikation, beide verstarben. Alle Patienten mit einem Tumor ohne Telomeraseaktivität hingegen überlebten. Da auch diese Zahl an Proben sehr klein ist, ist mit einer Aussage sehr vorsichtig umzugehen. Man könnte jedoch davon ausgehen, daß im Stadium IVs bei Nachweis eines telomeraseexprimierenden Tumors, nicht mehr von einem günstigen Verlauf der Erkrankung ausgegangen werden kann, der in diesem Stadium meistens anzunehmen ist.

Auch im Stadium IV, obgleich nicht signifikant, verdeutlicht die Überlebenskurve eine schlechtere Prognose derjenigen Patienten mit einem telomeraseexprimierenden Neuroblastom. 14 Patienten aus diesem Stadium wiesen ein telomeraseexprimierendes Neuroblastom auf, elf von ihnen verstarben (79%). Von den 31 Patienten ohne Telomeraseaktivität des Tumors verstarben 16 (51%). Die Lebenserwartung der Patienten in diesem weit fortgeschrittenem Stadium ist bereits so schlecht, daß ein signifikanter Unterschied in der Prognose anhand der Telomerase nicht festzumachen ist.

Die beiden disseminierten Stadien IV und IVs sind klinisch meist schwer zu unterscheiden. Da jedoch im ersten Fall eine massive Therapie eingeleitet werden muß und im letzteren Fall eine abwartende Haltung eingenommen werden kann, ist eine exakte Unterscheidung dieser beiden Stadien von ganz besonderer Bedeutung. Die Analyse der Überlebenskurve dieser beiden Stadien verdeutlicht, daß die Telomeraseaktivität hinsichtlich der Prognose und damit eines Therapieregimes eine Entscheidungshilfe sein könnte. So zeigt sich nämlich eine signifikant schlechtere Lebenserwartung der Patienten mit einem telomeraseexprimierendem Neuroblastom in diesen Stadien. In der Reihe der telomeraseexprimierenden Tumoren befinden sich zwei aus dem Stadium IVs, die beide zum Versterben des Patienten geführt haben. Aus dem Stadium IV führten elf von 14 zum Versterben des Patienten. Insgesamt verstarben in dieser Gruppe 13 von 16 Patienten (81%). Demgegenüber überlebten alle neun Patienten aus dem Stadium IVs und 15 Patienten aus dem Stadium IV ohne Telomeraseaktivität ihres Tumors. Insgesamt verstarben 40% der Patienten in der Gruppe der

Stadien IV und IVs. Betrachtet man also die Stadien IV und IVs zusammen und versucht anhand der Telomeraseaktivität auf den Verlauf zu schließen, so kann die nachweisbare Telomeraseaktivität zumindest Neuroblastome mit einer großen Potenz zur Progression herausfiltern. Sie könnte so bei Zweifeln in der Zuordnung zu einem Stadium herangezogen werden.

Für die Überlebensanalyse der beiden fortgeschrittenen Stadien III und IV ergibt sich keine signifikante Aussage, auch hier läßt sich wieder nur ein angedeutet schlechterer Verlauf der Erkrankung bei den Patienten mit telomerasepositivem Tumor erkennen.

Bei den Stadien mit einer an sich guten Prognose (I, II und IVs) hingegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Prognose bei Nachweis von Telomerase.

Es ist zu vermuten, daß im fortgeschrittenen Stadium Telomeraseaktivität alleine keinen großen Einfluß mehr hat, da zu viele andere Faktoren, wie Ausbreitung des Tumors und andere genetische Auffälligkeiten auftreten, während dies in den Stadien mit guter Prognose nicht der Fall ist.

Wir erhofften uns, bereits anhand der Telomeraseaktivität eine Zuordnung zu dem ein oder anderen Stadium machen zu können. Auch eine Zuordnung zu einer Gruppe von Stadien wie negative Telomeraseaktivität bei Stadium I, II und IVs und positiver Telomeraseaktivität bei III und IV wäre bereits hilfreich. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit läßt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und dem Stadium erkennen, so daß die Stadieneinteilung unter Zuhilfenahme der Telomeraseaktivität nicht vereinfacht wird. Es wird deutlich, daß das prognostisch schlechteste Stadium IV mit einem höheren Anteil an telomeraseexprimierenden Tumoren einhergeht als die prognostisch günstigeren Stadien I, III und IVs. Der insgesamt relativ gleichmäßige Anteil an telomeraseexprimierenden Neuroblastomen in den einzelnen Stadien läßt jedoch vermuten, daß die Telomeraseaktivität unabhängig vom Stadium ist. Was das Stadium II mit dem höchsten Anteil an Neuroblastomen mit Telomeraseaktivität betrifft, so ist sicherlich eine größere Zahl an untersuchten Neuroblastomen im Stadium II nötig, um eine definitive Aussage machen zu können.

Die Daten von Reynolds et al. weisen eine deutliche Zunahme der Tumoren mit positivem Nachweis von hTR mit steigendem Stadium auf. Weiterhin nimmt auch der durchschnittliche Wert der hTR-Expression von 17 im Stadium I bis hin zu 60 im Stadium III und IV stetig zu (Reynolds et al., 1997).

Hiyama et al. beschreiben in ihren Daten lediglich eine höhere Stadienzugehörigkeit der Patienten mit einem hochtelomerasepositivem Tumor verglichen mit den Patienten ohne Telomerasenachweis ihres Tumors (Hiyama et al., 1997). Beide Aussagen erscheinen nachvollziehbar, da ein Tumor mit nachweisbarer Telomeraseaktivität ein höheres Wachstumspotential hat und so weiter fortschreiten kann als ein Tumor, dessen Progressionsmöglichkeit ohne Telomerase irgendwann endet. Weiterhin ist die Tumormasse in den Stadien III und IV bereits vielfach größer, so daß auch eine Telomeraseaktivität, die erst im Laufe des Tumorwachstums auftrat, schon in einem großen Anteil des Gewebes nachzuweisen sein kann. Eine vereinfachte Stadienzuteilung unter Zuhilfenahme der Telomeraseaktivität wird auch in diesen beiden Studien nicht erwähnt.

6.5 KORRELATION DER TELOMERASEAKTIVITÄT MIT ANDEREN GENETISCHEN MARKERN FÜR DAS NEUROBLASTOM

6.5.1 KORRELATION DER TELOMERASEAKTIVITÄT MIT MYCN-AMPLIFIKATION

Eine unregulierte Expression von c-MYC, dessen Protein eine Funktion in der Kontrolle von Zellproliferation und -differenzierung ausübt, kann durch Genamplifikation, retrovirale Insertion und chromosomale Translokation verursacht werden (Wu et al., 1999). Wang et al. beschrieben, daß die Expression von c-MYC in primären epithelialen Zellen, die keine Telomeraseaktivität aufwiesen, zu einer Aktivierung der Telomerase führte. Im Gegensatz dazu konnte eine solche Aktivierung durch andere virale Onkoproteine wie E7, RAS^{v12}, cyclinD1, cdc25C und cdc25A nicht beobachtet werden (Wang et al., 1998).

Wu et al. konnten zeigen, daß c-MYC direkt Einfluß auf die Telomeraseaktivität nimmt, indem es die Expression der mRNA für die katalytische Untereinheit (hTERT) induziert und so einen limitierenden Faktor beeinflusst. Sie stellten fest, daß der hTERT-Promotor zahlreiche Bindungsstellen für c-myc enthält, die die Aktivierung der Transkription von hTERT vermitteln. hTERT, das in normalen Epithelzellen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde durch die Transduktion mit einem Myc-Retrovirus mindestens 50fach induziert. Trotzdem kann man nicht ausschließen, daß verschiedene Signale am Promotor von hTERT angreifen können und somit zur Aktivität des Enzyms in der Zelle beitragen (Wu et al., 1999). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von c-MYC zu MYCN, die in der Einleitung bereits kurz erwähnt wurde, könnte man vermuten, daß MYCN den gleichen oder einen ähnlichen aktivierenden Einfluß auf die Enzymaktivität der Telomerase hat.

Die Studie von Hiyama et al. 1995 zeigte, daß in 100 Neuroblastomen 16% eine außergewöhnlich hohe Telomeraseaktivität aufwiesen. Von diesen 16 zeigten 11 eine MYCN-Amplifikation und damit eine sehr gute Korrelation der beiden Faktoren (Hiyama et al., 1995b).

Auch unsere Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang dieser beiden Faktoren. Zwar konnten wir in unserer Versuchsreihe nur in neun der 28 eindeutig telomeraseexprimierenden Neuroblastome eine MYCN-Amplifikation feststellen, es zeigte sich aber ein deutlicher Anstieg der telomerasepositiven Tumoren mit zunehmender Zahl der Kopien der MYCN-Amplifikation. Von neun Tumoren mit einer MYCN-Amplifikation im Bereich von vier- bis zwanzigfacher Kopie weist lediglich ein Neuroblastom Telomeraseaktivität auf. Bis auf eine Ausnahme weisen alle Neuroblastome, bei denen eine MYCN-Amplifikation mit 25 Kopien und mehr vorliegt, Telomeraseaktivität auf. Dies könnte bedeuten, daß auch die Zahl der Kopien eine Rolle im Zusammenspiel von MYCN-Amplifikation und Telomeraseaktivität spielt.

Die Wahrscheinlichkeit der Telomeraseaktivierung scheint mit dem Ausmaß der MYCN-Amplifikation zu steigen.

Auch wenn die Myc-Onkogene Telomerase in einer großen Anzahl von Tumoren induzieren, ist davon auszugehen, daß Telomerase auch auf anderen Wegen reguliert werden kann.

Hierfür spricht nachweisbare Telomeraseaktivität in nicht amplifizierten Neuroblastomen und in vielen anderen Neoplasien, für die bisher keine regelmäßig auftretenden Amplifikationen eines Gens der MYC-Familie bekannt sind. Zudem könnten telomerasenegative Zellen alternative Strategien, für die es zahlreiche Hinweise gibt, zur Erhaltung ihrer Telomeren entwickeln und so auch ohne Telomeraseaktivität zur ungehemmten Proliferation fähig sein (Bryan et al., 1997). Die Strategie, die zur Telomererhaltung von einer individuellen Zelle

genutzt wird, ist wahrscheinlich abhängig von der Konstellation der genetischen Alteration, die sie auf ihrem Weg in die neoplastische Transformation erwirbt.

Betrachtet man den Anteil der Tumoren mit Telomeraseaktivität in den beiden Gruppen der MYCN-amplifizierten und nicht-amplifizierten Neuroblastome, so fällt in der Gruppe der amplifizierten Tumoren ein doppelt so hoher Anteil an Tumoren mit Telomeraseaktivität auf. Die Kaplan-Meyer-Überlebensanalyse weist weder in der Gruppe der MYCN-amplifizierten Tumoren noch in der Gruppe der nicht-amplifizierten Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose der Neuroblastome mit Telomeraseaktivität auf. Die Analyse deutet jedoch den schlechteren Verlauf der Patienten an, die einen telomeraseexprimierenden, MYCN-amplifizierten Tumor aufweisen.

Desweiteren wurden Neuroblastome beschrieben, die zwar keine Amplifikation des MYCN-Gens aufweisen, durch vermehrte Transkription aber zu einer erhöhten Expression dieses Gens gelangen (Cohn et al., 1990) und ebenfalls mit einer schlechten Prognose einhergehen (Christiansen et al., 1993). Für diese Arbeit lagen nur Informationen über die Amplifikation von MYCN vor und keine Analysen über das Ausmaß der Expression an sich. Es wäre also möglich, daß eine gesteigerte Expression in einigen nicht-amplifizierten Tumoren zur Aktivierung der Telomerase führt.

6.5.2 KORRELATION DER TELOMERASEAKTIVITÄT MIT LOH 1p36

Sowohl der Verlust der Heterozygotie von 1p36 als auch die Amplifikation des MYCN-Gens korrelieren bekanntermaßen mit einer schlechten Prognose für den Patienten. Desweiteren ergaben die Untersuchungen von Brodeur et al. eine strenge Korrelation der beiden Faktoren miteinander, wobei allerdings bisher nicht geklärt ist, ob es sich hierbei um unabhängige prognostische Variablen handelt (Fong et al., 1989). Die meisten Fälle mit einer MYCN-Amplifikation zeigen gleichzeitig einen LOH bei 1p36, umgekehrt konnte dies aber nicht beobachtet werden, so daß man vermuten könnte, daß ein Deletion von 1p der Genamplifikation vorausgeht (Brodeur et al., 1997c).

Der beschriebene Zusammenhang von MYCN-Amplifikation und Telomerase läßt die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Telomeraseaktivität und LOH 1p36 aufkommen.

Diese Tendenz zeigt sich zwar in unseren Ergebnissen, jedoch ist aufgrund der kleinen Anzahl an Tumoren mit einem nachgewiesenen LOH 1p36 keine statistisch signifikante Korrelation nachzuweisen. Die Hälfte (5/10) der Neuroblastome mit einem LOH 1p36 wiesen gleichzeitig Telomeraseaktivität auf, während dies hingegen nur bei ca. einem Viertel der Neuroblastome mit heterozygotem Zustand für 1p36 der Fall war.

Demnach könnte vermutet werden, daß zunächst durch die Deletion im Bereich 1p36 die Voraussetzung für die Amplifikation des MYCN-Gens und damit dessen Überexpression geschaffen wird. Im weiteren Verlauf könnte die Aktivierung der Telomerase durch stark exprimierte MYCN-Proteine verursacht werden.

Unsere Daten zeigen in der Gruppe der zehn Neuroblastome mit LOH 1p36 vier Tumoren (40%), in denen sowohl MYCN-Amplifikation als auch Telomeraseaktivität nachgewiesen werden kann. In der Gruppe der 54 für 1p36 heterozygoten Neuroblastome findet sich lediglich ein Tumor (~2%), der beide genetischen Veränderungen aufweist, aber sechs weitere Tumoren, mit einer MYCN-Amplifikation und sogar 15 Tumoren mit nachweisbarer Telomeraseaktivität.

Weder für die Amplifikation von MYCN, noch für die Telomerase ist der Weg über LOH 1p36 demnach die einzige Möglichkeit zur Aktivierung. Vermuten ließe sich, daß ein Zusammenhang zwischen LOH 1p36 und Telomeraseaktivität nur über MYCN besteht und keine direkte Wirkung vorliegt.

Wie bereits erwähnt ist es denkbar, daß für die Aktivierung der Telomerase durch MYCN-Expression ein gewisses Ausmaß an Expression erreicht werden muß. Die Überexpression von MYCN, hervorgerufen durch LOH 1p36 könnte diese Voraussetzung erfüllen. Eine MYCN-Amplifikation ohne LOH 1p36, hervorgerufen durch andere unbekannte Faktoren, wäre demnach nicht ausreichend, um zur Aktivierung der Telomerase zu führen.

Mehrere Arbeitsgruppen fanden Deletionen in zwei verschiedene Regionen des kurzen Arms von Chromosom 1, konnten allerdings nicht eindeutig klären, ob es sich um zwei verschiedene Tumorsuppressorgene in diesem Bereich handelt. Zur Zeit nimmt man an, daß ein Gen in nahezu allen Fällen mit 1p Deletion betroffen ist, während ein weiteres in einem zweiten proximalen Locus nur in Fällen mit MYCN-Amplifikation deletiert ist (Brodeur et al., 1997; Schleiermacher et al., 1994; Caron et al., 1995). Da die strukturelle Aberration des Chromosoms 1 auch in einer Vielzahl anderer maligner Erkrankungen beschrieben wird, handelt es sich im ersten Fall vermutlich um ein allgemein genetisches Prinzip der Tumorgenese und im zweiten Fall um eine gesonderte Deletion, die in Neuroblastomen zur Amplifikation von MYCN führt (Douglas et al., 1985).

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Neuroblastom ist der häufigste solide Tumor im Kindesalter außerhalb des ZNS. Diese Erkrankung ist besonders kompliziert durch ihren schwer vorhersehbaren Verlauf und die deutlich unterschiedliche Prognose in den einzelnen Stadien, zu denen die Zuordnung häufig nicht einfach gelingt. So kann er sich in einem Stadium trotz ausgeprägter Metastasierung plötzlich spontan zurückbilden oder zu einem benignen Geschwulst ausreifen. In lokalisierten, zunächst als günstig eingeschätzten Stadien hingegen, muß man ein schnelles, nicht aufzuhaltendes Wachstum feststellen. Diese Tatsache wirft für das Neuroblastom immer wieder die Frage nach neuen Markern auf, die einen Hinweis auf den weiteren Verlauf der Erkrankung geben können und so Hilfestellung bei der Wahl der richtigen Therapie geben. Dieses erhofft man sich von der Telomerase. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, das in den letzten zehn Jahren intensiv erforscht wurde, da es der Zelle dazu verhilft, ihre normalerweise eingeschränkte Teilungsfähigkeit zu überwinden. Die Zelle erlangt so eine unendlich große Wachstumspotenz, die ein wichtiger Bestandteil in der Tumorgenese ist. In vielen anderen Tumoren wurde sie in bis zu 99% der Fälle nachgewiesen, wo sie eindeutig mit einer schlechten Prognose und einem progressiven Verlauf der Erkrankung korreliert.

In dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung der Telomeraseaktivität in Neuroblastomen für deren Prognose und ihr Zusammenhang mit anderen Markern untersucht werden.

Hierfür wurden 109 Neuroblastome verschiedener Stadien mittels des Telomerase-PCR-ELISA auf Telomeraseaktivität untersucht. Die Tumorproben entstammen der Tumorbank des Neuroblastomlabors, unter der Leitung von PD Dr. H. Christiansen (vormals Gießen, jetzt Marburg).

Für die Aktivitätsmessung verwendeten wir das Kit für ‚Telomerase PCR ELISA‘ der Firma Boehringer Mannheim. Es wurden kleinste Teile der Tumoren lysiert und anschließend nach dem ‚telomeric repeat amplification protocol‘ weiterbearbeitet. Dieses Protokoll beruht auf dem Prinzip, Produkte der Telomerase nachzuweisen. Hierfür macht man sich ihre Funktion zu Nutze, telomerische DNA an einen Primer zu hängen, die anschließend mittels der PCR amplifiziert wird und so in nachweisbaren Mengen vorliegt. Liegt in der Probe keine Telomerase vor, wird keine DNA synthetisiert und somit auch nicht amplifiziert - das Ergebnis ist negativ. In einem weiteren Arbeitsschritt kann eine Amplifikation durch Antikörpermarkierung der telomer-spezifischen Sequenz und nachfolgender Farbreaktion im ELISA nachgewiesen werden.

Die Messung der Telomeraseaktivität und der Vergleich mit Daten anderer Arbeitsgruppen führte zu folgenden Ergebnissen:

1. In 28 der 109 untersuchten Neuroblastome konnte eindeutig Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, während hingegen 68 der Tumoren als telomerasenegativ und 13 als grenzwertig eingestuft wurden. Eine Aktivität in über 90% der Tumoren wie in den meisten anderen Versuchsreihen konnte nicht gefunden werden.
2. Der Nachweis von Telomeraseaktivität in einem Neuroblastom, ungeachtet der Stadien- oder Altersverteilung, korreliert eindeutig mit einer schlechten Prognose des Patienten und hat daher Bedeutung als negativer Prognosefaktor.
Die größte prognostische Aussagekraft ergibt sich allerdings für die Gruppe der Säuglinge, die normalerweise aufgrund ihres Alters eine relativ gute Prognose haben, welche sich bei Nachweis von Telomeraseaktivität des Neuroblastoms entscheidend verschlechtert und so bisher noch nicht beschrieben wurde.

3. Wir konnten in unserer Versuchsreihe eine signifikante Korrelation der Telomeraseaktivität mit der Amplifikation des MYCN-Gens belegen. Die jüngsten Daten zeigen hier, daß die mRNA Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase durch das c-MYC-Protein verstärkt wird und lassen so auch eine Vermutung auf eine solche aktivierende Rolle von MYCN zu.
4. Die Telomeraseaktivität bietet bei der Zuordnung zu den Stadien I bis IV keine Hilfestellung, kann aber innerhalb der einzelnen Stadien auf eine Gruppe von Patienten mit einer schlechteren Lebenserwartung hinweisen. So zeigt sich in den höheren Stadien III und IV ein deutlich schlechterer Verlauf der Erkrankung bei den Patienten mit einem telomeraseexprimierenden Tumor. In den Stadien IV und IVs, die gelegentlich klinisch schwer zu unterscheiden sind, könnte Telomeraseaktivität in Zweifelsfällen eine Entscheidungshilfe sein. Hier sind allerdings Studien mit einer höheren Anzahl an IVs Neuroblastomen notwendig.
5. Es konnte keine Korrelation zwischen Telomeraseaktivität und der partiellen Monosomie des kurzen Armes von Chromosom 1 (1p36) festgestellt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Albanell J, Han W, Mellado B, Gunawardane R, Scher HI, Dmitrovsky E (1996)

‚Telomerase activity is repressed during differentiation of maturation-sensitive but not resistant human tumor cell lines‘

Cancer Res 1996 (56), pp 1503-1508

2. Arnheim N, Erlich H (1992)

‚Polymerase chain reaction strategy‘

Ann Rev Biochem 1992 (61), pp 131-156

3. Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW (1996)

‚Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues‘

Cancer Res 1996 (56), pp 645-650

4. Bachmann KD, Dominick HC, Mildenerger H (1990)

‚Neuroblastom, Ganglioneurom, Phäochromozytom‘

in KD Bachmann ‚Pädiatrie in Praxis und Klinik‘ Vol.3 1990, pp 16.48-16.54

5. Barinaga M (1997)

‚The telomerase picture fills in‘

Science 1997 (276), pp 528-529

6. Beckwith J, Perrin E (1963)

‚In situ neuroblastomas: A contribution to the natural history of neural crest tumors‘

Am J Pathol 1963 (43), pp 1989

7. Berthold F (1997)

‚Commentary‘

Eur J Cancer 1997 (33), pp 1437-1438

8. Besho F, Hashizume K, Nakajo T, Kamoshita S (1991)

‚Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children‘

J Pediatr 1991 (119), pp 237

9. Blackburn EH (1992)

‚Telomerases‘

Annu Rev Biochem 1992 (61), pp 113-129

10. Breslow N, Mc Cann B (1971)

‚Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma‘
Cancer Res 1971 (31), pp 2098-2103

11. Brinkschmidt C, Poremba C, Christiansen H, Simon R, Schäfer KL, Terpe HJ, Lampert F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B (1998)

‚Comparative genomic hybridization and telomerase activity analysis identify two biologically different groups of 4s neuroblastomas‘
Br J Cancer 1998 (77), pp 2223-2229

12. Broccoli D, Young JW, de Lange T (1995)

‚Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells‘
Proc Natl Acad Sci USA 1995 (92), pp 9082-9086

13. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984)

‚Amplification of N-Myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage‘
Science 1984 (224), pp 1121

14. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A (1988)

‚International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma‘
J Clin Oncol 1988 (6), pp 1874-1881

15. Brodeur GM, Azar C, Brother M (1992)

‚Neuroblastoma: effect of genetic factors on prognosis and treatment‘
Cancer 1992 (70), pp 1685

16. Brodeur GM (1995a)

‚Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas‘
Eur J Cancer 1995 (31A), pp 505

17. Brodeur GM (1995b)

‚Do the ends justify the means?‘
Nat Med 1995 (1), pp 203-205

18. Brodeur GM (1997a)

‚Foreword‘
Eur J Cancer 1997 (33), pp 1909-1910

- 19. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS (1997b)**
 ‚Biology and genetics of human neuroblastomas‘
 J Pediatr Hematol Oncol 1997 (19), pp 93-101

- 20. Brodeur GM, Castleberry RP (1997c)**
 ‚Neuroblastoma‘
 in PA Pizzo, DG Poplack ‚Principles and Practice of pediatric oncology‘ 1997, pp 761-797

- 21. Bryan TM, Reddel RR (1997)**
 ‚Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalised human cells‘
 Eur J Cancer 1997 (33), pp 767-773

- 22. Campisi J (1997)**
 ‚The biology of replicative senescence‘
 Eur J Cancer 1997 (33), pp 703-709

- 23. Caron H, Peter M, van Sluis P (1995)**
 ‚Evidence for two tumour suppressor loci on chromosomal bands 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with N-myc amplification‘
 Hum Mol Genet 1995 (4), pp 535-539

- 24. Castleberry RP (1997)**
 ‚Pediatric update: Neuroblastoma‘
 Eur J Cancer 1997 (33), pp 1430-1438

- 25. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S (1995)**
 ‚Telomerase activity associated with aquisition of malignancy in human colorectal cancer‘
 Cancer Res 1995 (55), pp 2533-2536

- 26. Christiansen H, Lampert F (1988)**
 ‚Tumor karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma‘
 Br J Cancer 1988 (57), pp 121-126

- 27. Christiansen H, Lampert F (1989)**
 ‚Tumorzytogenetik und Prognose beim Neuroblastom‘
 Monatsschr Kinderheilkd 1989 (137), pp 636-640

- 28. Christiansen H, Delattre O, Fuchs S, Theobald M, Christiansen NM, Berthold F, Lampert F (1994)**
 ‚Loss of the putative tumor suppressor-gene locus 1p36 as investigated by a PCR-assay and N-myc amplification in 48 neuroblastomas: results of the german neuroblastoma study group‘
 Prog Clin Biol Res 1994 (385), pp19-25

- 29. Christiansen NM, Christiansen H, Berthold F, Lampert F (1993)**
 ‚Transcriptional activity of N-myc and ngf-r in 50 primary neuroblastomas as predictor for clinical outcome‘
 Int J Oncol 1993 (3), pp 853-857

- 30. Cohn SL, Salwen H, Quasney MW, Ikegaki N, Cowan JM, Herst CV, Kennett RH, Rosen ST, DiGiuseppe JA, Brodeur GM (1990)**
 ‚Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification‘
 Oncogene 1990 (5), pp 1821-1827

- 31. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992)**
 ‚Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity‘
 EMBO J 1992 (11), pp 1921-1929

- 32. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA (1998)**
 ‚Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT, the catalytic subunit of telomerase‘
 Oncogene 1998 (16), pp 1217-1222

- 33. Croce CM, Klein G (1990)**
 ‚Chromosomentranslokation und Krebs‘
 Spektrum der Wissenschaft ‚Krebs-Tumoren, Zellen, Gene‘ 1990, pp 102-109

- 34. Dahse R, Fiedler W, Ernst G (1997)**
 ‚Telomeres and telomerase: biological and clinical importance‘
 Clin Chem 1997 (43), pp 708-714

- 35. Douglas EC, Green AA, Hayes FA, Etcubanas E, Horowitz M, Wilimas JA (1985)**
 ‚Chromosom 1 abnormalities: a common feature of pediatric solid tumors‘
 J Nat Can Inst 1985 (75), pp 51-53

- 36. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, Le S, West MD, Harley CB, Andrews WH, Greider CW, Villeponteau B (1995)**
 ‚The RNA component of human telomerase‘
 Science 1995 (269), pp 1236-1241

- 37. Finkel E (1996)**
 ‚Telomerase highlights senescence as factor in cancer‘
 Lancet 1996 (347), pp 529

38. Fong CT, Dracopoli NC, White PS (1989)

‚Loss of heterozygosity for chromosome 1p in human neuroblastoma: correlation with N-Myc amplification‘

Proc Natl Acad Sci USA 1989 (86), pp 3753

39. Greider CW, Blackburn EH (1987)

‚The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity‘

Cell 1987 (51), pp 887-898

40. Greider CW, Blackburn EH (1989)

‚A telomeric sequence in the RNA of tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis‘

Nature 1989 (337), pp 331-337

41. Greider CW (1991)

‚Telomerase is processive‘

Mol Cell Biol 1991 (11), pp 4572-4580

42. Greider CW (1996)

‚Telomere length regulation‘

Annu Rev Biochem 1996 (65), pp 337-365

43. Greider CW (1999)

‚Telomerase activation; one step on the road to cancer‘

TIG 1999 (15), pp109-112

44. Gupta J, Han LP, Wang P, Gallie BL, Bacchetti S (1996)

‚Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity‘

J Natl Cancer Inst 1996 (88), pp 1152-1157

45. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL (1995)

‚Incidence of cancer in children in the United States‘

Cancer 1995 (75), pp 2186

46. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO (1997)

‚A mammalian telomerase-associated protein‘

Science 1997 (275), pp 973-977

47. Hayflick L (1965)

,The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains‘
Exp Cell Res 1965 (37), pp 614-634

48. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y (1995a)

,Telomerase activity in gastric cancer‘
Cancer Res 1995 (55), pp 3258-3262

49. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW (1995b)

,Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes‘
Nat Med 1995 (1), pp 249-255

50. Hiyama E, Gallohan L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW (1996)

,Telomerase activity in human breast cancer‘
J Natl Cancer Inst 1996 (88), pp 116-122

51. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay JW, Yokoyama T (1997)

,Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour?‘
Eur J Cancer 1997 (33), pp 1932-1936

52. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Fukuba I, Yamaoka H, Shay JW, Matsuura Y (1999)

,Rapid detection of MYCN Gene Amplification and Telomerase Expression in Neuroblastoma‘
Clin Cancer Res 1999 (5), pp 601-609

53. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW (1995c)

,Telomerase activity in small-cell and non-small- cell lung cancer‘
J Natl Cancer Inst 1995 (87), pp 895-902

54. Holt SE, Wright WE, Shay JW (1997)

,Multiple pathways for the regulation of telomerase activity‘
Eur J Cancer 1997 (33), pp 761-766

55. Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D (1998)

,Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effects in breast cancer‘
Int J Cancer 1998 (79), pp 8-12

56. Hoos A, Nekarda H (1999)

‚Telomerase- Potential und Grenzen der klinischen Anwendbarkeit‘
Dtsch med Wschr 1999 (124), pp 223-230

57. Hughes M, Marsden HB, Palmer MK (1974)

‚Histologic pattern of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging‘
Cancer 1974 (34), pp 1706-1711

58. Iwao T, Hiyama E, Yokoyama T, Tsuchida A, Hiyama K, Murakami J, Shimanoto F, Shay JW, Kajiya G (1997)

‚Telomerase activity for the preoperative diagnosis of pancreatic cancer‘
J Natl Cancer Inst 1997 (89), pp 1621-1622

59. Joshi VV, Tsongalis GJ (1997)

‚Correlation between morphologic and nonmorphologic prognostic markers of neuroblastoma‘
Ann Y Acad Sci 1997 (824), pp 71-83

60. Kemeny DM (1994)

‚ELISA: Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischem Labor‘
Gustav Fischer Verlag 1994, pp 1-122

61. Kim N, Piatyszek M, Prowse K, Harley C, West M, Ho P (1994)

‚Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer‘
Science 1994 (266), pp 2011-2014

62. Kipling D (1995)

‚Telomerase: immortality enzyme or oncogene?‘
Nat Gen 1995 (9), pp 104-106

63. Klingelhutz AJ (1997)

‚Telomerase activation and cancer‘
J Mol Med 1997 (75), pp 45-49

64. Knudson AGJ, Strong LC (1972)

‚Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma‘
Am J Hum Gen 1972 (24), pp 514

65. Lachmund A, Sachse GE (1994)

„Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche“
in Gassen HG „PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerasekettenreaktion“ 1994,
pp 1-12

66. Lendvay TS, Morris DK, J Sah, Balasubramanian B, Lundblad V (1996)

„Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication
identify three additional EST genes“
Genetics 1996 (144), pp 1399-1412

67. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992)

„Telomere end-replication problem and cell aging“
J Mol Biol 1992 (225), pp 951-960

68. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997a)

„Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase“
Science 1997 (276), pp 561-567

69. Lingner J, Cech TR, Hughes TR, Lundblad V (1997b)

„Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast
telomerase activity“
Proc Natl Acad Sci USA 1997 (94), pp 11190-11195

70. Liu JP (1999)

„Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity“
Faseb J 1999 (13), pp 2091-2104

71. Maitra A, Yashima K, Rathi A, Timmons CF, Rogers BB, Shay JW, Gazdar AF (1999)

„The RNA Component of Telomerase as a marker of biological potential and clinical outcome
in childhood neuroblastic tumors“
Cancer 1999 (85), pp 741-749

72. Maris JM, Kyemba SM, Rebbeck TR, White PS, Sulman EP, Jensen SJ, Allen C, Biegel JA, Brodeur GM (1997)

„Molecular genetic analysis of familial neuroblastoma“
Eur J Cancer 1997 (33), pp 1923-1928

73. Matthay KK (1998)

„Stage 4s neuroblastoma: what makes it special“
J Clin Oncol 1998 (16), pp 2003-2006

- 74. Mayfield MP, Shah T, Flannigan GM, Hamilton Stewart PA, Bibby MC (1998)**
,Telomerase activity in malignant and benign bladder conditions‘
Int J Mol Med 1998 (5), pp 835-840

- 75. McClintock B (1941)**
,The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*‘
Genetics 1974 (41), pp 234-282

- 76. Mehle C, Lindblom A, Ljungberg B, Stenling R, Roos G (1998)**
,Loss of heterozygosity at chromosome 3p correlates with telomerase activity in renal cell carcinoma‘
Int J Onc 1998 (13), pp 289-295

- 77. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA (1997)**
,hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization‘
Cell 1997 (90), pp 785-795

- 78. Miller RW, Young JL jr., Novakovic B (1995)**
,Childhood cancer‘
Cancer 1995 (75), pp 395

- 79. Morin GB (1997)**
,The implications of telomerase biochemistry for human disease‘
Eur J Cancer 1997 (33), pp 750-760

- 80. Müller HJ (1938)**
,The remaking of chromosomes‘
The collecting net 1938 (13), pp 181-198

- 81. Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986)**
,Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction‘
Cold Spr Har Symp Quant Bio 1986 (51), pp 263-273

- 82. Nakamura TM, Cech TR (1998)**
,Reversing time: Origin of telomerase‘
Cell 1998 (92), pp 587-590

83. Ohmura H, Tahara H, Suzuki M, Die T, Shimizu M, Yoshida MA, Tahara E, Shay JW, Barrett JC, Oshimura M (1995)

‚Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3‘

Jpn J Cancer Res 1995 (86), pp 899-904

84. Pai RB, Pai SB, Kukhanova M, Dutschmann GE, Guo X, Cheng YC (1998)

‚Telomerase from human leukemia cells: properties and its interaction with deoxynucleoside analogues‘

Cancer Res 1998 (58), pp 1909-1913

85. Poremba C, Willenbring H, Hero B, Christiansen H, Schäfer KL, Brinkschmidt C, Jürgens H, Böcker W, Dockhorn-Dworniczak B (1999)

‚Telomerase activity distinguishes between neuroblastoma with good and poor prognosis‘

Ann Oncol 1999 (10), pp 715-721

86. Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW, Wang H, Lukens JN, Matthay KK, Seeger RC (1997)

‚Telomerase expression in primary neuroblastomas‘

Eur J Cancer 1997 (33), pp 1929-1931

87. Rhode V, Sommerfeld HJ, Sattler HP, Wullich B (1998)

‚Telomerase in Tumoren: Fakten und Perspektiven‘

Urologe 1998 (37), pp 386-394

88. Rhyu MS (1995)

‚Telomeres, Telomerase, and Immortality‘

J Nat Can Inst 1995 (87), pp 884- 894

89. Riede UN, Saeger W (1993)

‚Nebennierenmark‘

in Riede UN, Schäfer HE ‚Allgemeine und spezielle Pathologie‘ 1993, pp 986-988

90. Sawada T, Matsumura T, Kawakatsu H (1991)

‚Long-term effects of mass screening for neuroblastoma in infancy‘

Am J Pediatr Hematol 1991 (13), pp 3

91. Schleiermacher G, Peter M, Michon J (1994)

‚Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma‘

Genes Chrom Cancer 1994 (10), pp 275-281

92. Schwab M (1992)

„Molecular cytogenetics of human neuroblastoma“
Chem et Biophys Acta 1992 (1114), pp 43-50

93. Shay JW (1997)

„Telomerase in human development and cancer“
J Cell Phys 1997 (173), pp 266-270

94. Shay JW, Bacchetti S (1997)

„A survey of telomerase activity in human cancer“
Eur J Cancer 1997 (33), pp 787-791

95. Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ, Parkinson EK, Keith WN (1997)

„Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer“
Oncogene 1997 (14), pp 1013-1021

96. Stanton LW, Schwab M, Bishop JM (1986)

„Nucleotide sequence of the human N-myc gene“
Proc Natl Acad Sci USA 1986 (83), pp 1772-1776

97. Takita J, Hayashi Y, Yokota J (1997)

„Loss of heterozygosity in neuroblastomas- an overview“
Eur J Cancer 1997 (33), pp 1971-1973

98. Thomas L (1988)

„Enzymimmunoassay (EIA)“
in Thomas L „Labor und Diagnose“ 1988, pp 1464-1467

99. Turkel SB, Itabashi HH (1975)

„The natural history of neuroblastic cells in the fetal adrenal gland“
Am J Pathol 1975 (76), pp 225

100. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman SR (1998)

„Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase transcription (hTERT) and by alternative splicing of hTERT transcripts“
Cancer Res 1998 (58), pp 4168-4172

101. Virchow R (1863)

„Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren“
in A Hirschwald „Die krankhaften Geschwülste“ Vol.2 1863, pp 148-150

102.Voute PA (1984)

‚Neuroblastoma‘

in Sutow WW, Fernbach DJ, Viatt TJ ‚Clinical pediatric oncology‘ 1984, pp 559

103.Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ (1998)

‚Myc activates telomerase‘

‚Gen & Dev 1998 (12), pp 1769-1774

104.Wargalla-Plate U, Hero B, Berthold F (1995)

‚Neuroblastom: Diagnostik und Therapie‘

Praxis 1995 (84), pp 1152-1157

105.Woods WG, Tuchmann M, Bernstein ML (1992)

‚Screening for neuroblastoma in North America: 2-years results from the Quebec project‘

Am J Pediatr Hematol Oncol 1992 (14), pp 312

106.Wright WE, Shay JW (1992)

‚The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalisation‘

Exp Gerontol 1992 (27), pp 383-389

107.Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996)

‚Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells‘

Dev Gen 1996 (18), pp 173-179

108.Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R (1999)

‚Direct activation of TERT transcription by c-myc‘

Nat Gen 1999 (21), pp 220-224

109.Xu D (1998)

‚Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukemia‘

Br J Cancer 1998 (102), pp 1367-75

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

dATP = (Desoxy-)Adenosintriphosphat

dCTP = (Desoxy-)Cytidintriphosphat

dGTP = (Desoxy-)Guanosintriphosphat

dTTP = (Desoxy-)Thymidintriphosphat

DIG = Digoxigenin

DNA = Desoxyribonucleic acid

ELISA = Enzyme linked immunabsorbent assay

hTERT = subkatalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase

hTR = RNA-Komponente der menschlichen Telomerase

INSS = Internationales Neurolblastom Stadien System

kd = Kilodalton

LDH = Lactat dehydrogenase

LOH = Loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)

MIBG = I-131-Metabenzylguanidin

MRT = Magnetresonanztomographie

NBL = Neurolblastom

nm = Nanometer

NSE = Neuronen spezifische Enolase

nt = Nukleotide

OD = Optische Dichte

PCR = Polymerase chain reaction

POD = Peroxidase

rd = rad

RNA = Ribonucleic acid

Taq-Polymerase = DNA-Polymerase aus dem Bakterium Thermus aquaticus

TMB = Tetramethylbenzidine

TRAP = Telomeric repeat amplification protocol

TRK-A = Tyrosin-Kinase-Rezeptor A

9.2 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. H. Christiansen danke ich für die Bereitstellung des Themas und Ermöglichung der Arbeit, für die engagierte Betreuung und die zahlreichen wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. med. F. Berner und Herrn Dr. rer. nat. M. Theobald, die mir jederzeit mit Rat und Tat zu Seite standen, danke ich für die vielfältige Unterstützung, die hilfreichen Tips und die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Desweiteren ein herzliches Dankeschön an Frau R. Engel und S. Wendehold, die mir gerade in der Anfangsphase meiner Arbeit in sämtlichen Laborfragen zur Seite standen.

Für die statistische Beratung danke ich Herrn W. Pabst aus dem Institut für medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Desweiteren danke ich Herrn C. Saure für die Hilfe bei der graphischen Ausarbeitung dieser Arbeit.

9.3 LEBENSLAUF

MELANIE MÜLLER

14. JULI 1974	Als erstes von drei Kindern der medizinisch-technischen Assistentin Helga Christine Müller, geb. Zimmermann, und des Gynäkologen Rolf Wilhelm Müller in Lübeck geboren.
1980-1983	Grundschule Steinbach Fernwald-Steinbach
1983-1986	Pestalozzischule Gießen
1986-1993	Liebig-Schule Gießen
1993	Abitur an der Liebig-Schule in Gießen
1993-2000	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/1995	Physikum
08/1996	Erstes Staatsexamen
03/1999	Zweites Staatsexamen
06/2000	Drittes Staatsexamen
	Famulaturen: Innere Medizin (JLU Gießen) Innere Medizin (Universität von Marseille, Frankreich) Anästhesie (St-Josefs-Krankenhaus Gießen) Gynäkologie (Lismore-Base-Hospital, Australien)
	Praktisches Jahr : Innere Medizin (JLU Gießen) Pädiatrie (JLU Gießen) Chirurgie (Minneapolis (USA) und JLU Gießen)
1995-1999	Studentische Laborkraft im Akutlabor der Chirurgie der JLU
1996-1998	Praktischer Teil der Promotionsarbeit an der JLU in Gießen bei PD.Dr.H.Christiansen im Neuroblastomlabor der Universitätskinderklinik Gießen
seit 01/2001	Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Klinik III/Medizinischen Poliklinik der JLU Gießen/Hessen